MUTASYNTHESE UND GERICHTETE FERMENTATION IN DER NIKKOMYCINREIHE

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

JÜRGEN DELZER

aus Wolfsburg

1983

MUTASYNTHESE UND GERICHTETE FERMENTATION IN DER NIKKOMYCINREIHE

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

JÜRGEN DELZER

aus Wolfsburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 24. März 1983

Dekan: Professor Dr. K.-P. Hadeler

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Zähner

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. H. Wolf

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

"Wenn ich denke, daß es uns eine geläufige Tatsache geworden ist, daß auch die Grundlagenforschung in der Kernphysik heute die höchste Geheimnisstufe hat, daß unsere Laboratorien von den militärischen Instanzen bezahlt und wie Kriegsobjekte bewacht werden, wenn ich denke, was im gleichen Fall aus den Ideen des Kopernikus oder den Entdeckungen Newtons geworden wäre, dann frage ich mich, ob wir den Geist der Wissenschaft nicht wirklich verraten haben, als wir unsere Forschungsarbeiten den Militärs überließen, ohne an die Folgen zu denken."

J. R. Oppenheimer
vor dem Sicherheitsausschuß der Atomenergiekommission (1954).

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543907_0044

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Zähner am Institut für Biologie II, Lehrstuhl für Mikrobiologie I, der Universität Tübingen durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, die ständige Diskussionsbereitschaft und die großzügige Förderung möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. H. Zähner herzlich bedanken.

Herrn Dr. H.-P. Fiedler danke ich ganz besonders für die Bereitstellung sowie die beständige Verbesserung der HPLC-Analytik und Frl. A. Döhle für die zum Teil recht aufwendige Durchführung.

Den weiteren Mitarbeitern des Nikkomycin-Kränzchens, Dr. Ch. Bormann, Dr. R. Kurth, Dr. J. Langhärig, Dr. H. Müller, Dipl. Biol. F. Walz und Dr. W. Zitzmann, gilt mein Dank für die fruchtbare Zusammenarbeit und die anregenden Diskussionen.

Herrn K. Wusch danke ich für das Zeichnen der Abbildungen und die vielen interessanten Gespräche.

Allen Mitarbeitern der Lehrstühle Mikrobiologie I und II danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	MATERIAL UND METHODEN	
1.	Chemikalien	6
2.	Nährmedien	7
3.	Mikroorganismen	9
3.1.	Nikkomycinproduzenten	9
3.2.	Stamm für Chitinsynthase-präparation	9
3.3.	Pilze	10
4.	Wirkungsspektrum	10
4.1.	Plattendiffusionstest	10
4.1.1.	Testplatten mit Mucor hiemalis (+/-)	11
4.1.2.	Testplatten für das Wirkungs-spektrum	11
4.2.	Test mit Candida albicans	11
5.	Kulturbedingungen Tü 901	11
5.1.	Stammhaltung	11
5.2.	Schüttelkolbenversuche	12
5.3.	resting-cell Versuche	12
5.4.	Fermentation	12
5.4.1.	10 l Fermentation	12
5.4.2.	20 l Fermentation	12
5.4.3.	pO_2-feeding-Fermentation	13
6.	Meß- und Regelvorgänge am Fermenter	13
6.1.	pH-Messung und Regelung	13
6.2.	pO_2-Messung und Regelung	13
6.3.	Bestimmung des Luftvolumens	13
7.	Untersuchungen der Fermenta-tionsproben	14
7.1.	Myceltrockengewicht	14

Seite

7.2. Nikkomycinbestimmung 14
7.2.1. Plattendiffusionstest 14
7.2.1. Analytische HPLC 14
8. Isolierung und Charakterisierung 14
8.1. Aufarbeitung der Nikkomycine 14
8.2. Isolierung der roten Barbitursäureverbindung 16
8.3. UV-Spektroskopie 16
8.4. IR-Spektroskopie 17
8.5. Stabilitätstest 17
8.6. Hochspannungselektrophorese 17
8.7. Chitinsynthase aus Coprinus cinereus zur K_i-Bestimmung 17
9. Regressionsgeraden, Korrelationskoeffizienten und Standardabweichungen (σ) 18

III. ERGEBNISSE

1. Veränderung des resting-cell-Systems 19
2. Suche nach neuen Nikkomycinen 19
3. Fermentation 24
4. Isolierung und Charakterisierung 32
4.1. Isolierung der Nikkomycine 33
4.2. Isolierung der "roten Substanz" aus der Barbitursäurezugabe 35
4.3. Strukturformeln der neuen Nikkomycine 35
4.4. Physikalische Daten der neuen Substanzen 37
4.4.1. Stabilitätsverhalten 37
4.4.2. UV- und IR-Spektren der neuen Nikkomycine 37
4.4.3. UV- und IR-Spektren der roten Barbitursäuresubstanz 37
4.5. Barbitursäure 42

Seite

4.6. Bestimmung der Inhibitorkonstanten der Nikkomycine Z_T, J_T, Z_H und J_H an der Chitinsynthase aus Coprinus cinereus 44

4.7. Test auf Kreuzresistenz 48

4.8. Wirkungsspektrum 48

4.9. Versuche zur Biogenese der 4-Formyl-4-Imidazolin-2-on-Base 50

IV. DISKUSSION

1. Baseneinbau 54

2. Wirkung der Nikkomycine auf die Chitinsynthase aus Coprinus cinereus 57

3. Biologischer Test 59

4. Barbitursäure 60

5. Produktion neuer Nikkomycine 60

6. Biogenese der Nikkomycin X-Base 63

V. ZUSAMMENFASSUNG 65

VI. LITERATUR 66

Im Text wurden folgende Abkürzungen verwendet:

Abb.	Abbildung
Ba	Barbitursäure
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen Berlin, Göttingen
His	Histidin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IR	infrarot
MHK	Minimale Hemmkonzentration
PAP	Pyridin-Acetat-Puffer
pO_2	Sauerstoffpartialdruck
rpm	revolutions per minute
TG	Trockengewicht
t(h)	Fermentationszeit in Stunden
Tü	Stammsammlung des Institutes für Biologie II, Lehrstuhl für Mikrobiologie I, Tübingen
UDP	Uridin-Diphosphat
Ura	Uracil
UV	ultraviolett
vvm	Volumen Luft/Volumen Nährlösung/Minute
Wt.	Wildtyp

I. EINLEITUNG

Von den ca. 6000 bis 1979 beschriebenen Antibiotika wurden 91 kommerziell fermentationstechnisch, außerdem 46 semisynthetisch und zwei - Chloramphenicol und Pyrrolnitrin - chemisch hergestellt (Perlman, 1979).

Aufbauend auf den gefundenen Grundstrukturen erhielt man, vor allem bei den β-Lactamen, Tetracyclinen und Aminoglycosiden, 60 000 - 70 000 semisynthetische Antibiotika. Von den semisynthetischen sind also 0,1 % und von natürlichen 2 % in der Anwendung (Bérdy, 1980).

Trotzdem besteht immer noch ein großer Bedarf an neuen Antibiotika, da noch nicht alle in Frage kommenden Felder abgedeckt sind (Zähner, 1978). Ein wichtiges Anwendungsgebiet ist der Pflanzenschutz, da hier neben quantitativ hohen Verlusten (Bauer et al., 1981) auch qualitative Veränderungen durch Mykotoxine (Lyr et al., 1981) auftreten. Viele chemische Pflanzenschutzmittel zeigen folgende Nachteile: a) eine unselektive Toxizität b) schlechte Abbaubarkeit c) Anreicherung über die Nahrungskette (Misato, 1977).

Demgegenüber werden Pflanzenschutzantibiotika in geringeren Konzentrationen (1/10 - 1/100) eingesetzt, und außerdem findet ein schneller Abbau durch Bodenorganismen statt (Crüger und Crüger, 1982).

Die Nikkomycine wurden aus dem Kulturfiltrat von Streptomyces tendae Ettlinger Tü 901 isoliert (Höhne, 1974; Dehler, 1979). Durch chemischen Abbau, Teilsynthesen und mit spektroskopischen Methoden konnte gezeigt werden, daß es sich um Nukleosid-Peptid-Antibiotika handelt (Dähn et al., 1976; Hagenmaier et al., 1979; König et al., 1980). Abbildung 1 zeigt die Strukturen aller bisher bekannten natürlichen Nikkomycine. Die biologisch aktiven Verbindungen bestehen aus einer Aminohexuronsäure, einer daran N-glycosidisch

gebundenen Base - Uracil oder 4-Formyl-4-Imidazolin-2-on - und einer an die Aminogruppe peptidisch gebundenen ungewöhnlichen L-Aminosäure. Bei den Nikkomycinen Z,X,I und J handelt es sich um 5-Hydroxypyridylhomothreonin und bei B und B_x um p-Hydroxyphenylhomothreonin. Die Nikkomycine I und J enthalten zusätzlich L-Glutamat, das über eine Peptidbindung mit der freien Carboxylgruppe der Hexuronsäure verknüpft ist.

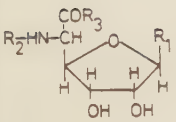
Die in Japan gefundenen Polyoxine (Isono und Suzuki, 1979) sind den Nikkomycinen sehr ähnlich (Abbildung 2) und hemmen wie diese die Chitinsynthase aus Pilzen (Brillinger, 1979; Müller et al., 1981; Sasaki et al., 1968; Endo et al., 1970) und aus dem Insekt Tribolium castaneum (Cohen und Casida, 1980). Außerdem ist Nikkomycin Z/X sehr gut wirksam gegen Spinnmilben (Zoebelein, 1979; Zoebelein, 1980).

Die Suche nach neuen Antibiotika wird rein statistisch immer schwieriger, und der Anteil derer, die sich auf dem Markt durchsetzen, geht zurück - bis 1960 waren es 5 %, zwischen 1961 und 1965 2,6 % und zwischen 1966 und 1971 nur noch 1 % (Bérdy, 1974).

Verzichtet man deshalb auf die Suche neuer Grundkörper, bleiben neben chemischen Total- und Teilsynthesen folgende Wege zur Variation schon bekannter Antibiotika übrig:

- gerichtete Fermentation - durch Zugabe ungewöhnlicher Vorstufen (z.B. Penicillin V, 5-Fluorpolyoxin L/M)
- Verwendung von Inhibitoren (z.B. Sulfonamiden) oder Induktoren (z.B. Barbiturate) in verschiedenen Stufen der Biosynthese (z.B. Rifamycin B, Lincomycine)
- Mutasynthese - durch Einsatz von Mutanten, die in speziellen Schritten der Antibiotikabiosynthese blockiert sind (Idiotrophe) und der Zugabe einer ungewöhnlichen Vorstufe (z.B. Hybrimycine, Mutamycine)
- Erweiterung der Fermentationsbedingungen in osmophile, psychrophile oder thermophile Bereiche. Anaerobe oder extrem lange Fermentationen

Abb. 1: Strukturformeln der Nikkomycine



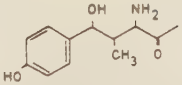
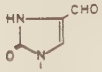
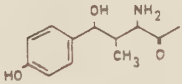
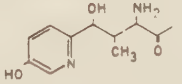
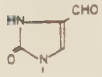
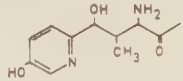
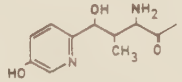
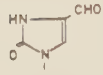
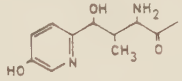
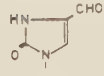
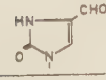
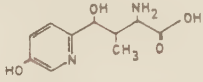
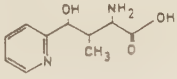
NIKKOMYCIN	R_1	R_2	R_3
B			OH
B_x			OH
Z			OH
X			OH
J			Glu
I			Glu
N		H	Glu
M		H	Glu
C		H	OH
C_x		H	OH
D			
E			

Abb. 2: Strukturformeln der Polyoxine

- Biotransformation - Veränderung der Substanz durch einen zweiten Mikroorganismus oder die isolierten Enzyme (z.B. 6-Aminopenicillansäure)
- Einsatz von Mutanten des Antibiotikumproduzenten (z.B. Demethylchlortetracyclin)
- Genetische Veränderungen: Deregulierung, Protoplastenfusion, Plasmidübertragung, Transduktion etc.

Da durch die genetische Bearbeitung des Nikkomycinproduzenten ein Set an Mutanten vorhanden war und gezeigt werden konnte, daß L-Histidinol wahrscheinlich Vorstufe der 4-Formyl-4-Imidazolin-2-on Base ist (Langhärig, 1981) und sich die Uracil-Base aus dem Pyrimidinstoffwechsel ableitet (Delzer, 1980), bot sich die bei den Aminoglycosiden erfolgreich eingeführte Mutasynthesetechnik an (Shier et al., 1969).

Diese hat gegenüber der gerichteten Fermentation den Vorteil, daß keine Konkurrenzreaktion mit dem natürlichen Substrat, das eine höhere Affinität zum Enzym besitzt als die neue Vorstufe, auftritt. Da nur noch das neue Produkt gebildet wird, entfällt die sehr aufwendige präparative Trennung nahe verwandter Substanzen (Daum und Lemke, 1979). Durch eine speziell ausgearbeitete HPLC-Analytik (Fiedler, 1981) ist das Auffinden neuer Nikkomycine erleichtert.

Aufgabe dieser Arbeit war es, die Nikkomycine auf der Basenseite mit Hilfe der Mutasynthesetechnik zu variieren. Die neuen Substanzen sollten sowohl in vitro an der Chitinsynthase von Coprinus cinereus als auch in vivo gegen verschiedene Pilze getestet werden, um Struktur-Wirkungsbeziehungen aufzustellen.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Ansonsten wurden analysenreine Chemikalien der Firma Merck, Darmstadt, verwendet.

Bio-Rad Laboratories GmbH, München	Biogel P 2
Brenntag, Mühlheim/Ruhr	Niax-Polyol LHT 67
Deutsche Ajinomoto GmbH, Hamburg	L-Asparagin-Monohydrat
Deutsche Maizenawerke, Hamburg	Cerelose (D-Glucose), Mannit, Stärke
Deutsche Pharmacia, Frankfurt	SP Sephadex C-25
Diamalt AG, München	L-Isoleucin
Difco Laboratories, Detroit, USA	Bacto Agar, Bacto Corn-Meal Agar, Bacto Pepton
Hedinger, Stuttgart	Hyphlo Supercel (Celit)
Oxoid Deutschland, Wesel	Malt Extract, Yeast Extract
Sigma Chemie GmbH, München	MES (2-(N-Morpholino)Äthan-sulfonsäure), Rinderserumalbumin (BSA)
Serva Feinbiochemica, Heidelberg	Tween 80, Dowex 50 WX 4, Amberlite IRA 401 S, L-Histidinol 2 HCl, Uracil, Digitonin, EDTA x Na_2 (Äthylen-diamintetraessigsäure), Tris (Tris-(hydroxy-methyl)-aminomethan), Uridin Diphospho-N-Acetyl Glucosamin x Na_2- Salz, L-Histidin x HCl

Radiochemical Centre, Amersham, Buckinghamshire, England	Uridin Diphospho-N-Acetyl-D-(U-^{14}C)Glucosamin, Ammoniumsalz (247 mCi/mmol)

Basen für die Mutasynthese

Bayer AG, Wuppertal	5-Aminouracil, 5-Chlorbarbitursäure, 5,5-Dimethylhydantoin, 3,6-Dioxo-1,2,3,6-Tetrahydropyridazin, 5-Formyluracil, 5-Nitrouracil
EGA Chemie, Keppler & Reif, Steinheim, Albuch	3-Amino-1,2,4-Triazol, Adenin, 6-Azauracil, 2,3-Dihydroxychinoxalin, Benzimidazol, Guanin, Thymin, 2-Methylimidazol, 3-Methyl-5-Pyrazolon, 2-Merkaptobenzimidazol
Merck AG, Darmstadt	Barbitursäure
Serva Feinbiochemica, Heidelberg	Cytosin, 5-Hydroxymethyluracil
Sigma Chemie GmbH, München	5-Bromuracil, 5-Fluoruracil, Isoorotsäure, 5-Joduracil

2. Nährmedien

Nach dem Einstellen des pH-Wertes wurden die Nährmedien 20 Minuten bei 121°C sterilisiert. Die Gewichtsangaben beziehen sich auf 1 l Wasser. Bei Minimalmedien wurde entionisiertes Wasser verwendet.

a) Medien für Testplatten

Medium 1	Medium 2 Malzmedium für Ustilago
17 g Corn-meal-Agar	20 g Malzextrakt
1 l Aqua deion.	20 g Agar

Medium 3 Hefe-Malz-Medium für Pilze

Die Zusammensetzung stimmt mit der von Medium 6 überein. Der pH-Wert wurde jedoch auf pH 4,5 eingestellt.

b) Medien für den Test mit Candida albicans

Medium 4 CGPY-Medium

6 g Na_2HPO_4
3 g NaCl
2 g NH_4Cl
0,1 g $MgCl_2 \times 6 H_2O$
0,15 g Na_2SO_4
3 g KH_2PO_4
10 g Bactopepton
10 g Hefeextrakt
5 g Glucose (getrennt sterilisiert)

Medium 5 YM 1 Medium

27,2 g KH_2PO_4
0,2 g $MgSO_4 \times 7 H_2O$
0,1 g NaCl
0,6 g $(NH_4)_2SO_4$
1,0 g Glucose
10,0 g Na-Glycerinphosphat
1,0 g Casaminoacid

c) Medien für Schrägröhrchen und Testplatten

Medium 6

4 g Glucose
10 g Malzextrakt
4 g Hefeextrakt
20 g Agar
pH 7,3

Medium 7

10 g Glucose
0,5 g Asparagin
0,5 g $K_2HPO_4 \times 7H_2O$
0,5 g $MgSO_4 \times 7H_2O$
0,5 g NaCl
0,2 g $CaCO_3$
20 g Agar
pH 7,3

d) Medien für die Nikkomycinproduktion

Medium 8 (Dehler, 1979)

10 g Stärke
30 g Mannit (für resting-cell Versuche nur 20 g)
10 g Hefeextrakt
20 g Sojamehl
pH 7,0

Medium 9

10 g Stärke
30 g Mannit
20 g Sojamehl
2 g Isoleucin
0,1 g Valin
0,1 g Leucin
4 g Asparagin
pH 6,0

resting-cell Medium

(verändert nach Kurth, 1981)

20 g Mannit
0,16 g Asparagin
50 mM MES
0,01 g $CuSO_4 \times 5 H_2O$
0,1 g $MgSO_4 \times 7 H_2O$
0,02 g $FeSO_4 \times 7 H_2O$
0,1 g KCl
0,1 g $CaCl_2$
(1,3 g Isoleucin)
pH 6,0

feeding-Lösung (Kurth, 1981)

450 g Cerelose
50 g Isoleucin

Isoleucin wurde getrennt mit verdünnter H_2SO_4 in Lösung gebracht und getrennt sterilisiert.

3. Mikroorganismen

3.1. Nikkomycinproduzenten

Streptomyces tendae Ettlinger Tü 901/8c Wt. (Kurth, 1981)
Tü 901/158 Ura^-
Tü 901/172 Ura^-
Tü 901/292 Ura^-,His^-

Die Mutanten wurden von Herrn Langhärig (1981) hergestellt.

3.2. Stamm für Chitinsynthasepräparation

Coprinus cinereus (SCHAEFF. ex Fr.) S. F. GRAY (= C. lagopus sensu Buller).

3.3. Pilze

		Kulturbedingungen Temp. (°C)/Medium
Alternaria kikuchiana Tanaka	Tü 169	27 / 1[1]
Alternaria mali Bayer AM-S 9/17		24 / 1
Alternaria mali Bayer AM-PxR 9/17		24 / 1
Botrytis cinerea PERSOON & FRIES	Tü 157	24 / 3[1]
Candida albicans (ROBIN) Berkhout	Tü 565	27 / 4/5
Chaetomium globosum KUNZE & FRIES	Tü 138	27 / 3[1]
Colletotrichum acutaxum	Tü 8064	27 / 3
Corticium sasakii	Tü 8008	27 / 3[1]
Endomyces magnusei LUDWIG	Tü 167	27 / 3
Mucor hiemalis (+) WEHMER	Tü 179	20 / 3
Mucor hiemalis (-) WEHMER	Tü 180	20 / 3
Mucor miehei COONEY et EMERSON	Tü 284	37 / 3
Mucor racemosus	DSM 26768	27 / 3
Paecilomyces variotii BAINIER	Tü 137	37 / 3
Scopulariopsis brevicaulis	Tü 8058	20 / 3[1]
Sordaria macrospora	Tü 128	27 / 3
Trametes zonata		24 / 3
Trichophyton mentagrophytes	Tü 510	27 / 3[1]
Ustilago maydis (BECKMANN) UNGER	Tü 567	27 / 2

Medium[1]: bei diesen Organismen wurden zweischichtige Platten verwendet.

4. Wirkungsspektrum

4.1. Plattendiffusionstest

Der Test wurde wie bei Zähner & Maas (1972) beschrieben in Petrischalen der Firma Greiner, Nürtingen, mit Filterrondellen von 6 mm ø (Macherey & Nagel, Düren) durchgeführt.

4.1.1. Testplatten mit Mucor hiemalis (+/-)

Die Durchführung ist bei Kirst (1971) beschrieben.

4.1.2. Testplatten für das Wirkungsspektrum

Die Testorganismen wurden auf Medium 6 Platten bei den entsprechenden Temperaturen inkubiert, nach sieben Tagen mit 4-5 ml Tween-Wasser abgeschwemmt, zu 250 ml 40°C warmen Medium gegeben und in 17,5 ml Portionen gegossen. Für manche Organismen (siehe 3.3.) mußten zweischichtige Platten hergestellt werden. Zuerst wurde mit 10 ml Medium die Unterschicht gegossen und nach dem Erstarren mit 5 ml organismenhaltigem Medium überschichtet.

4.2. Test mit Candida albicans

Eine 16 Stunden alte Kultur von Candida albicans in CGPY-Medium wurde zweimal mit Saline gewaschen, in YM 1 Medium aufgenommen (E_{578}= 0,2), die Hemmstoffe in 1:2 Verdünnungsstufen steril mit der beimpften Nährlösung verdünnt und sowohl die morphologischen Veränderungen als auch die Extinktion nach 4, 6 und 20 Stunden Inkubationsdauer ermittelt. Als MHK wurde die niedrigste Hemmstoffkonzentration bestimmt, bei der noch signifikante morphologische Veränderungen auftraten (Frosch, 1983).

5. Kulturbedingungen Tü 901

5.1. Stammhaltung

Die Stämme wurden auf Schrägröhrchen mit Medium 6 überimpft, zwei Wochen bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C aufbewahrt. Zur Klonierung dienten Platten mit Medium 7.

5.2. Schüttelkolbenversuche

100 ml sterile Nährlösung in 500 ml Erlenmeyerkolben mit einem seitlichen Einstich wurden mit Sporen beimpft (Impföse) und auf einer rotierenden Schüttelmaschine (RC 106, Infors AG, Basel, Schweiz) bei 120 rpm mit einem Auslenkradius von 25 mm bei 27°C inkubiert.

5.3. resting-cell Versuche

Die Biomasse der Kulturen (Bedingungen siehe 5.2.; 64 Std. alt) wurden durch Filtration gewonnen, einmal mit sterilem Leitungswasser auf dem Filter gewaschen und doppelt konzentriert in resting-cell-Medium aufgenommen. 500 ml Erlenmeyerkolben mit einem seitlichen Einstich und 50 ml resting-cell-Medium wurden mit 50 ml der Suspension beschickt und anschließend, wie unter Abschnitt 5.2. angegeben, inkubiert.

5.4. Fermentation

Fermentationen wurden im 10 l - und 20 l Maßstab durchgeführt.

5.4.1. 10 l Fermentation

Der Fermenter (Typ F 0020, Fa. Chemap AG, Männedorf/Schweiz) mit Blattrührsystem wurde mit 9,5 l Medium in situ sterilisiert (30 Minuten bei 121°C), mit 0,5 l Vorkultur (Wildtyp 24 Stunden und Mutanten 36 Stunden alt) beimpft und bei 0,5 vvm, 300 rpm und 27°C fermentiert. Die Schaumbildung konnte durch 3 ml Polyol unterdrückt werden.

5.4.2. 20 l Fermentation

Der 20 l Fermenter (Typ b 20, AG für biologische Verfahrenstechnik, Fabrikation und Verkauf in Lizenz Giovanola Frères S.A., Monthey, Schweiz) mit Umwurfsystem wurde mit 19 l

Medium in situ sterilisiert (30 Minuten bei 121°C), mit 1 l Vorkultur (siehe 5.4.1.) beimpft und bei 0,5 vvm, 1200 rpm und 27°C fermentiert. Die Schaumbildung konnte durch 2 ml Polyol unterdrückt werden.

5.4.3. pO_2-feeding-Fermentation

Mit beiden Fermentertypen wurden pO_2-feeding-Fermentationen durchgeführt. Als Vorlage für die feeding-Lösung diente entweder ein graduiertes 2,4 l oder 1 l Gefäß, das ex situ sterilisiert wurde.

6. Meß- und Regelvorgänge am Fermenter

6.1. pH-Messung und Regelung

Es wurde eine in situ sterilisierbare Elektrode (Typ 465-VT, Fa. Ingold, Urdorf-Zürich, Schweiz) verwendet.

Die pH-Regelung erfolgte im 20 l Fermenter mit einem Regler der Firma Paratronic Typ A 931. Für den 10 l Fermenter ist sie bei Hasenböhler (1978) beschrieben.

6.2. pO_2-Messung und Regelung

Der Sauerstoffpartialdruck in der Submerskultur wurde kontinuierlich mit einer in situ sterilisierbaren Sauerstoffelektrode (Typ IL 531, Fa. Ingold, Urdorf-Zürich, Schweiz) gemessen.

Die pO_2-Regelung erfolgte mit dem Paratronic-Regler.

6.3. Bestimmung des Luftvolumens

Die Belüftungsrate wurde mit einem Laborgasmeter (Typ L5-PVC, Fa. Wohlgroth, Zürich, Schweiz) ermittelt.

7. Untersuchungen der Fermentationsproben

7.1. Myceltrockengewicht

Die Bestimmung des Myceltrockengewichts erfolgte, abgesehen davon, daß 10 ml Kultur abgesaugt wurde, wie bei Kurth (1981) beschrieben.

7.2. Nikkomycinbestimmung

7.2.1. Plattendiffusionstest

Durchführung wie unter Punkt 4.1.1..

7.2.2. Analytische HPLC

Mit Hilfe der HPLC war es möglich, sowohl die schon bekannten als auch die neuen Nikkomycine qualitativ und quantitativ zu erfassen (Fiedler, 1981).

8. Isolierung und Charakterisierung

8.1. Aufarbeitung der Nikkomycine

Die mit Essigsäure auf pH 4 eingestellte Kultur wurde nach Zusatz von 2 % Celit mit einer Mehrschichtenfilterpresse über die Filterschicht C 150 (Schenk Filterbau, Schwäbisch Gmünd) geklärt, das Kulturfiltrat (9 l) anschließend auf eine Dowex 50 WX 4 Säule (50 - 100 mesh, Na^+-Form, Bettvolumen 0,8 l, Fließgeschwindigkeit 2 l/h) aufgetragen und so lange mit entionisiertem Wasser gewaschen, bis der Säulendurchlauf farblos war. Die Elution erfolgte mit 0,05 N NH_3-Lösung. Das Eluat wurde fraktioniert aufgefangen, am Rotationsverdampfer vom NH_3 befreit und der pH-Wert mit Essigsäure auf pH 6 eingestellt.

Die substanzhaltigen Fraktionen wurden vereinigt, mit NH_3 auf pH 7,5 eingestellt und auf eine Amberlite IRA 401 S Säule (OH^--Form, Bettvolumen 0,5 l, Fließgeschwindigkeit 0,9 l/h) aufgetragen, die Säule mit dem hundertfachen Bettvolumen mit entionisiertem Wasser gewaschen und die gebundenen Nikkomycine mit 1 %-iger Ameisensäure eluiert.

Die entsprechenden Eluate wurden vereinigt, mit dem vorgegebenen pH-Wert (pH 2,2) auf eine SP Sephadex C 25 Säule (Pyridinium-Form, Bettvolumen 200 ml, Fließgeschwindigkeit 100 ml/h) aufgetragen und die Säule mit 7,2 Liter entionisiertem Wasser gewaschen. Mit 0,01 N PAP wurden Verunreinigungen und mit 0,05 N PAP (pH 4,7) die Nikkomycine eluiert.

Diese wurden eingeengt und auf Biogel P 2 (100 - 200 mesh, Bettvolumen 1,6 l, Fließgeschwindigkeit 120 ml/h, Fließmittel 0,1 % Essigsäure) aufgetragen. Man erhält eine Auftrennung in die Nikkomycine der Z/X- und I/J Gruppe. Da schon eine gewisse Antrennung in neue und alte Nikkomycine auftrat, wurden die einzelnen Fraktionen (Gläschen) getrennt eingeengt und in kleinen Portionen (0,3 ml) auf eine Biogel P 2 Säule (200 - 400 mesh, Bettvolumen 0,9 l, Fließgeschwindigkeit 14 ml/h, Fließmittel 0,1 % Essigsäure) aufgetragen. Durch mehrmalige Rechromatographie der Mischfraktionen konnten die neuen Nikkomycine der Z- und J-Reihe abgetrennt werden.

Diese wurden über eine LiChroprep RP 8 Säule (Korngröße 20 - 40 µm, Bettvolumen 125 ml, Fließgeschwindigkeit 30 ml/h, Fließmittel 0,1 % Essigsäure) von lipophilen Verunreinigungen befreit. Die Substanz wurde lyophilisiert, wieder in Wasser aufgenommen (40 mg Lyophilisat/ml entionisiertes Wasser), in kleinen Portionen (1 ml) auf die präparative-HPLC aufgespritzt und anschließend lyophilisiert.

8.2. Isolierung der roten Barbitursäureverbindung

Bis zur SP Sephadex C 25-Säule verlief die Aufarbeitung parallel zu der der Nikkomycine. Nach deren Abtrennung wurden die roten Fraktionen vereinigt, eingeengt und an Biogel P 2 (100 - 200 mesh, siehe 8.1.) chromatographiert. Beim Einengen der Substanz fiel diese aus. Durch Erwärmen im Wasserbad (80°C) konnte sie wieder gelöst werden und kristallisierte bei 4°C aus. Die roten Kristalle wurden in entionisiertem Wasser aufgenommen und über eine LiChroprep RP 8 Säule (siehe 8.1., Fließmittel entionisiertes Wasser) von Verunreinigungen abgetrennt. Die rote Hauptkomponente fiel nach dem Lyophilisieren als orangerotes Pulver an.

Aufbau der präparativen HPLC

Pumpe:	Pneumatische Kolbenpumpe (Haskel Mod. 26740)
Detektor:	Knauer Spektralphotometer (Wellenlänge 290 nm)
Säule:	LiChrosorb RP 8 (10 µm): die Dimensionen der Säule waren 16 mm Innendurchmesser bei 250 mm Länge (Fertigsäule der Firma Knauer)
Fließmittel:	0,01 % Essigsäure mit einer Fließgeschwindigkeit von 20 ml/Minute.

Die Proben wurden über eine 2 ml Schlaufe aufgetragen.

8.3. UV Spektroskopie

Die UV Adsorptionsspektren der Substanzen wurden mit einem Spektralphotometer DB-GT der Firma Beckmann, München, in 0,1 N HCl und 0,1 N NaOH aufgenommen. Die Messungen erfolgten in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm.

8.4. IR Spektroskopie

Die IR Adsorptionsspektren wurden mit einem Perkin-Elmer-Spektrograph, Modell 137, Überlingen, aufgenommen. Die aus 250 mg KBr hergestellten Preßlinge (Dudley und Fleming, 1971) enthielten 0,8 bis 1 mg der Substanz.

8.5. Stabilitätstest

Die gepufferten Antibiotikalösungen (pH 3, 7 und 10) wurden bei 20°C aufbewahrt und nach einem Tag und sieben Tagen auf ihre antibiotische Wirksamkeit geprüft.

8.6. Hochspannungselektrophorese

Die analytische Hochspannungselektrophorese wurde wie bei Zitzmann (1980) beschrieben durchgeführt und der verwendete Puffer nach der Vorschrift in Documenta Geigy (1968) angesetzt. Die Laufzeit betrug 30 Minuten bei einer angelegten Spannung von 3000 Volt. Der Nachweis des Antibiotikums erfolgte durch Bioautographie. Der Papierstreifen wurde so in Laufrichtung geschnitten, daß ein Viertel für die Bioautographie genügte. Der restliche Streifen konnte nach Festlegung der Aktivitätsverteilung für die selektive Elution (0,1 % Essigsäure) der Aktivitäten zum Test über die analytische HPLC verwendet werden.

8.7. Chitinsynthase aus Coprinus cinereus zur K_i-Bestimmung

Präparation

Die Durchführung ist bei Gooday und de Rousset-Hall (1975) beschrieben. Der Zellaufschluß erfolgte jedoch mit einer X-Press.

Die Proteinbestimmung wurde nach Lowry et al. (1951) und der Flurammethode (Weigele, 1976) durchgeführt. Rinderserumalbumin (BSA), das dieselbe Digitoninmenge wie die Enzympräparation enthielt, diente als Standard.

Chitinsynthasetest

Die Durchführung erfolgte ebenfalls nach Gooday und de Rousset-Hall (1975). Jeder Testansatz (20 µl) enthielt 5 µl Enzympräparation (1,0 µg Protein) und Endkonzentrationen von 63 mM Tris/HCl pH 7,5, 12,5 mM $MgCl_2$, 1,25 mM EDTA x Na_2 und 0,5 bzw. 1,0 mM UDP-N-Acetyl-Glucosamin (12,5 nCi UDP-(U-^{14}C)-N-Acetylglucosamin). Die Endkonzentrationen der Antibiotika (in H_2O gelöst) stehen im Ergebnisteil. Die Inkubationsdauer betrug 10 Minuten.

9. Regressionsgeraden, Korrelationskoeffizienten und Standardabweichungen (σ)

Die Regressionsgeraden, Korrelationskoeffizienten und Standardabweichungen der graphischen Darstellungen wurden mit dem Rechner Texas-Instruments 58 (Programme V 33 und V 35) berechnet.

III. ERGEBNISSE

1. Veränderung des resting-cell-Systems

Aufgrund der geringen Nikkomycinproduktion im resting-cell-Medium - Nikkomycin Z lag unter der Nachweisgrenze in der HPLC - mußte das vorhandene System (Kurth, 1981) verändert werden. Die Biomasse wurde verfünffacht und die Mannitkonzentration verdoppelt. 1,6 g/l Asparagin wirkten sich auf die Nikkomycinbildung und den pH-Verlauf günstig aus.

Da wesentlich mehr Zellen benötigt wurden, mußte auch die Biomassegewinnung modifiziert werden. Das Abzentrifugieren des Mycels wurde durch einen Filtrationsschritt (MN 615, 17,5 cm ø, Macherey und Nagel, Düren) ersetzt. Der Mycelkuchen wurde einmal auf dem Büchnertrichter mit sterilem Leitungswasser gewaschen. Damit konnten innerhalb einer Std. die Zellen aus zwei Liter Kultur steril gewonnen werden.

In diesem System war die Produktion zehnmal höher und Nikkomycin Z gut nachweisbar (80 mg/l Nikkomycin Z und 300 mg/l Nikkomycin X). Damit hatte man ein sauberes, empfindliches Verfahren zur Produktion neuer Nikkomycine. Durch die Zugabe von 1,3 g/l Isoleucin konnte die Nikkomycinbildung nochmals verdoppelt werden.

2. Suche nach neuen Nikkomycinen

Sowohl den Mutanten von Streptomyces tendae Ettlinger Tü 901/172 (Ura^-) und Tü 901/292 (Ura^-/His^-) als auch dem Wildtyp Tü 901/8c wurden dreiundzwanzig verschiedene N-Heterozyklen - vor allem Pyrimidine, Purine und Imidazole (Tabelle 1) - im resting-cell-Medium angeboten. Davon zeigten die drei Pyrimidine - Thymin, 5-Hydroxymethyluracil und 5-Formyluracil - interessante Veränderungen in ihren HPLC-Spektren. Die neu gebildeten Substanzen wurden nach folgenden Kriterien auf ihre Nikkomycineigenschaften untersucht:

- Ihre pH-Stabilität sollte mit der der bekannten aktiven Nikkomycine übereinstimmen.
- Sie müssen sowohl an den Kationenaustauscher Dowex 50 WX 4 als auch an den Anionenaustauscher Amberlite IRA 401 S binden.
- Die Reihenfolge der Ausgangsbasen in Bezug auf Uracil sollte mit der der neuen Substanzen in Bezug auf Nikkomycin Z und J in der HPLC übereinstimmen.
- Sie müssen als Paare auftreten, da sowohl die Nikkomycin Z- als auch Nikkomycin J-analoge Verbindung gebildet werden muß.
- Sie müssen durch Isoleucinzugabe zum Medium besser gebildet werden, da Isoleucin die Nikkomycinbildung von der Aminosäureseite aus stimuliert (Sommer, 1981; Kurth, 1981).

Diese Bedingungen wurden von allen sechs Substanzen - aus drei Pyrimidinbasen - erfüllt.

Tab. 1: Verwendete Vorstufen

eingebaut:	"nicht" eingebaut:
Thymin	Isoorotsäure
5-Formyluracil	5-Bromuracil
5-Hydroxymethyluracil	5-Joduracil
	5-Fluoruracil
	5-Aminouracil
	5-Nitrouracil
	Cytosin
	Barbitursäure
	5-Chlorbarbitursäure
	6-Azauracil
	3,6-Dioxo-1,2,3,6-Tetrahydropyridazin
	5,5-Dimethylhydantoin
	3-Amino-1,2,4-Triazol
	2-Methylimidazol
	3-Methyl-5-Pyrazolon
	Adenin
	Guanin
	2-Merkaptobenzimidazol
	Benzimidazol
	2,3-Dihydroxychinoxalin

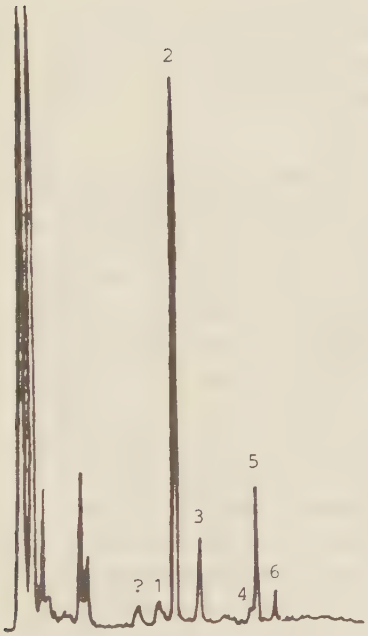


Abb. 3:
HPLC-Diagramm aus dem Kulturfiltrat einer Schüttelkultur in Medium 9 mit Thymin als Vorstufe

1 = Nikkomycin Z
2 = Nikkomycin X
3 = Nikkomycin Z_T
4 = Nikkomycin J
5 = Nikkomycin I
6 = Nikkomycin J_T
? = unbekannte Substanz

Abb. 4:
HPLC-Diagramm aus dem Kulturfiltrat einer Schüttelkultur in Medium 9 mit 5-Hydroxymethyluracil als Vorstufe

1 = Nikkomycin Z_H
2 = Nikkomycin Z
3 = Nikkomycin X
4 = Nikkomycin J_H
5 = Nikkomycin J
6 = Nikkomycin I
? = unbekannte Substanz

Mit Isoorotsäure wurde eine vierte Pyrimidinbase mit interessanten Eigenschaften gefunden. Durch die Isoorotsäurezugabe verstärkte sich die Nikkomycin Z- und J-Produktion. Dafür gibt es zwei Möglichkeiten:

- Isoorotsäure kann wie Orotsäure nach der Überführung ins Nukleosid zu Uridin decarboxyliert werden.
- Die neuen Verbindungen laufen genau an der gleichen Stelle in der HPLC wie die Nikkomycine Z und J.

Um dies abzuklären, wurden folgende Versuche durchgeführt:

- Das Kulturfiltrat wurde einer Hochspannungselektrophorese unterzogen. Mit einem Sörensen-Puffer (pH 6) blieben die bekannten aktiven Nikkomycine am Startpunkt liegen. Durch die zusätzliche Carboxylgruppe sollten die neuen in Richtung Anode laufen. Dies konnte durch Bioautographie, anschließende Elution des fraglichen Bereichs und Test mit der HPLC bestätigt werden.
- Mit einem Wachstumstest auf Minimalmedienplatten (Medium 7), die zusätzlich acht g/l Isoorotsäure enthielten, wurde mit einer Orotsäurephosphoribosyltransferase$^-$ Mutante (Tü 901/158), einer Mutante (Tü 901/172), deren genetischer Block weiter vorne im Pyrimidinstoffwechsel liegt, und dem Wildtyp als Kontrolle die Fähigkeit von Tü 901, Isoorotsäure zu decarboxylieren, untersucht. Isoorotsäure erwies sich als exzellenter Hemmstoff. Nach einer Inkubationsdauer von sieben Tagen konnte in allen Fällen nur ein minimales Untergrundwachstum festgestellt werden. Die Kontrollen mit Orotsäure (gleiche Molarität, gleicher pH-Wert) waren in den entsprechenden Fällen positiv.
- Die beiden Mutanten und der Wildtyp wurden im resting-cell-System auf ihre Nikkomycinproduktion bei Zugabe von Isoorotsäure (16 g/l) getestet. Immer war die Nikkomycin Z- und J-Produktion erhöht.

Diese Daten sprechen dafür, daß auch diese Pyrimidinbase in die Nikkomycine eingebaut wird. Die Einbaurate war jedoch gering, da erst mit 16 g/l Isoorotsäure eine deutliche Veränderung im HPLC-Spektrum erkennbar war.

Für Thymin, 5-Hydroxymethyluracil und 5-Formyluracil wurden im resting-cell-Medium die optimalen Vorstufenkonzentrationen ermittelt. Versuche mit Medium 9 zeigten die gleiche Konzentrationsabhängigkeit.

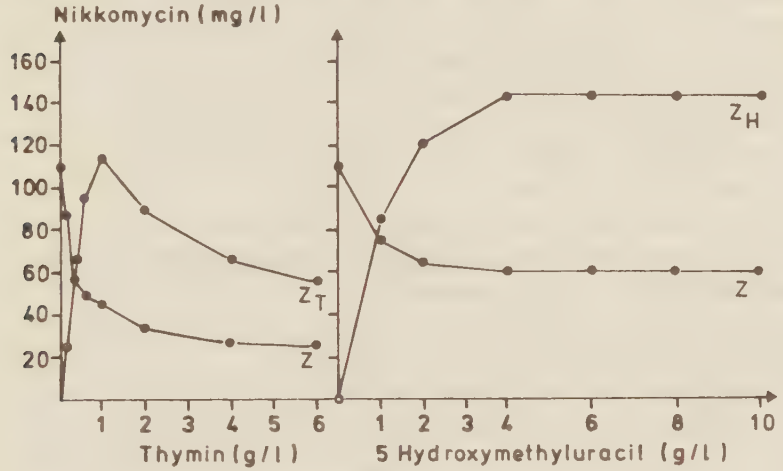


Abb. 5: Optimierung der Vorstufenkonzentrationen
Z = Nikkomycin Z
Z_T = Nikkomycin Z_T
Z_H = Nikkomycin Z_H

Wie man aus Abbildung 5 erkennt, ist ungefähr 1 g/l Thymin optimal für die Nikkomycin Z_t-Bildung, und 4 g/l 5-Hydroxymethyluracil genügen für die maximale Produktbildung von Nikkomycin Z_H. Diese Konzentrationen wurden in der Fermentation eingesetzt.

Für 5-Hydroxymethyluracil und 5-Formyluracil sind die Daten gleich. Das deutet darauf hin, daß aus den verschiedenen Basen die gleichen Nikkomycine gebildet werden. Versuche mit Dimedon - Aldehydreagenz - waren nicht eindeutig, da die HPLC-Analytik dadurch erheblich beinträchtigt wurde.

3. Fermentation

Über die Wahl der Fermentationsbedingungen sollte ein in Bezug auf die anderen Nikkomycine möglichst günstiges Produktverhältnis erzielt werden, da die Auftrennung der sehr ähnlichen Verbindungen schwierig ist. Durch die genetische Bearbeitung des Nikkomycinproduzentenstammes Tü 901 waren die entsprechenden Mutanten vorhanden, damit bot sich die Mutasynthesetechnik an. Interessant war die im Pyrimidin- und Histidinstoffwechsel blockierte Mutante Tü 901/292. Sie zeigte eine stark verminderte Nikkomycin Z,X,I und J Produktion. Diese Mutante sollte beim Anbieten einer neuen Vorstufe ein optimales Produktverhältnis zugunsten der mutasynthetischen Nikkomycine ergeben.

Zuerst mußte jedoch die für den Nikkomycinproduzenten entwickelte pO_2-feeding-Fermentation (Kurth, 1981) an die Mutante angepaßt werden. Es zeigte sich, daß sie ohne kontinuierliche Histidinzugabe frühzeitig lysierte. Deshalb wurde zwischen der 50. und 100. Fermentationsstunde in Abhänigkeit vom pO_2-Wert (pO_2 > 20 %) Histidin zudosiert. Das Histidinfeeding erfolgte erst nach 50 Stunden, damit die im Vollmedium vorhandenen, von der Mutante verwertbaren Zwischenprodukte des Histidinstoffwechsels metabolisiert wurden. Danach wurde die mit 0,25 g/l Histidin ergänzte feeding-Lösung angeschlossen, und bis zur 220. Stunde konnte in Abhängigkeit vom pO_2 gefeedet werden. Nach dieser Zeit trat verstärkt Mycelfragmentierung - Lyse - auf, so daß die Fermentationen abgebrochen werden mußten. Die Ausbeute lag für Nikkomycin Z_T bei 60 mg/l, für Z bei 20 mg/l und für X bei 55 mg/l.

Um das im Medium vorhandene Uracil und Histidinol zu verbrauchen, ohne daß es in Nikkomycine eingebaut werden konnte, wurden die Fermentationen in den ersten 50 Stunden über pH 7 gehalten. Die Nikkomycinbildung war minimal. Mit der Vorstufenzugabe nach 50 Stunden erfolgte ein langsamer pH-shift (0,1 pH-Einheiten/Stunde) auf pH 6. Da die Pyrimidin-

basen zum Teil wachstumshemmende Eigenschaften besitzen, nicht metabolisiert werden sollten und außerdem die Nikkomycinbildung vorher relativ gering war, erwies es sich als sinnvoll, diese erst nach 50 Stunden zuzugeben.

Diese aufwendigen Fermentationsbedingungen und vor allem die geringe Produktbildung waren unbefriedigend. Da inzwischen mit Barbitursäure ein für die Nikkomycine X und I "negativer Effektor" gefunden wurde, war es nun möglich, die neuen Substanzen mit der Einfachmutante Tü 901/172 herzustellen.

Damit konnte auf die Histidinzugabe verzichtet werden. Die Fermentationsdauer blieb unverändert, die Produktbildung stieg bei gleichem Produktverhältnis auf 75 mg Nikkomycin Z_T pro Liter. Nach zusätzlicher Isoleucinzugabe (1,3 g/l) in Verbindung mit der Vorstufen- und Barbitursäurezugabe (1 g/l) erhöhte sich die Nikkomycin Z_T Konzentration auf 118 mg/l bei einem Nikkomycin Z Anteil von 38 mg/l. Nikkomycin X war nicht mehr nachweisbar.

Wie man aus Abbildung 6 erkennt, war die Produktbildungsgeschwindigkeit bis zur 146. Stunde hoch (1,1 mg Nikkomycin Z_T/l/h), danach fiel sie trotz Feeding ab (0,25 mg Nikkomycin Z_T/l/h). Diese Abflachung der Produktbildung trat bei allen Fermentationen mit Mutanten auf. Schon nach 40 Stunden Fermentationsdauer beginnt die relativ schnelle Trockengewichtsabnahme. Dies ist ein Indiz für die Instabilität der Mutanten bei längeren Fermentationszeiten. Nachteilig war außerdem die starke Melaninbildung. Streptomyces tendae Ettlinger bildet auf diesem Medium Melanine, wenn er nicht dauernd unter pH 5,5 gehalten wird. Dies mußte jedoch zugunsten der selektiven Produktion in Kauf genommen werden.

Alle isolierten Substanzen wurden nach diesem Schema fermentiert.

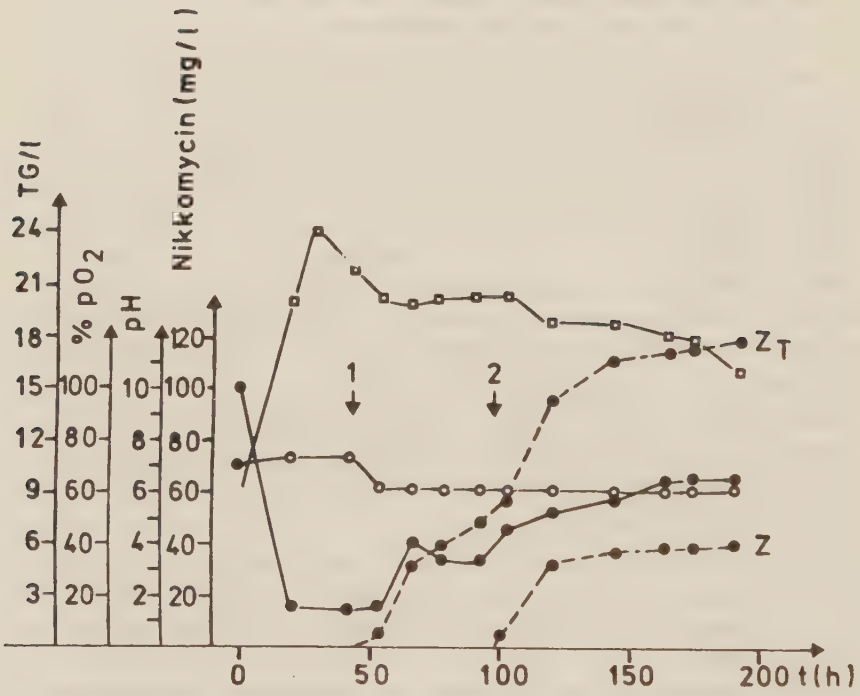


Abb. 6: feeding-Fermentation mit der Mutante Tü 901/172 und Thymin als Vorstufe.

1 = Thymin-, Isoleucin-, Barbitursäurezugabe und pH-shift

2 = feeding-Anfang (Feedingrate 0,55 ml/l/h)

—●—●Z = Nikkomycin Z

—●—●Z_T= Nikkomycin Z_T

—□—□ Trockengewicht

—○—○ pH-Wert

—●—● % pO_2

Da die Fermentationsdauer begrenzt und die Nikkomycinbildung immer noch unbefriedigend war, wurde für Nikkomycin Z_T überprüft, ob mit dem Wildtyp Tü 901/8c bessere Ergebnisse zu erzielen sind. Unter den gleichen Fermentationsbedingungen wie für die Mutante Tü 901/172 ist die Produktbildung zwar wesentlich besser (siehe Abbildung 7), das Produktverhältnis hat sich jedoch verschlechtert. Mit Minimalmedien sollte ein günstigeres Produktverhältnis erreicht werden. Da eigene Versuche und die Ergebnisse von Kurth (1981) zeigten, daß dann die Nikkomycinbildung sehr gering ist, war dies ungeeignet. Deshalb wurde das von Dehler (1979) optimierte Medium verändert. Auf die Verwendung des Hefeextraktes wurde verzichtet, da dieser sehr pyrimidinhaltig ist. Dies führte zu einem höheren Nikkomycin Z_T-Anteil, die Gesamtmenge war jedoch niedriger. Da Isoleucin die Nikkomycinbildung stimuliert, wurde deren Konzentration optimiert. Um wachstumshemmende Einflüsse des Isoleucins zu vermeiden, wurde je 0,1 g/l Leucin und Valin zugegeben. Das Optimum lag zwischen 4 und 6 g/l Isoleucin. Da 2 g/l für 90 % der maximalen Stimulierung genügen und mit Asparagin in der nächsten Optimierungsstufe eine gut verwertbare N-Quelle verwendet werden sollte, wurde mit dieser Konzentration weitergearbeitet. Durch diesen Schritt ließ sich sowohl die Produktbildung als auch das -verhältnis verbessern. Die Optimierung der Asparaginkonzentration brachte zwei Ergebnisse:

- Die Nikkomycin Z_T-Bildung wird bei 4 g/l Asparagin auf 130 % erhöht, und Nikkomycin Z geht auf 70 % zurück.
- Asparagin verschiebt das Dipeptid-Tripeptid-Verhältnis zugunsten der Tripeptide. Ohne Asparagin liegt das Verhältnis Nikkomycin Z_T: J_T bei 1,9 : 1, mit 4 g/l Asparagin jedoch bei 1,35 : 1. Dabei steigt die Nikkomycin Z_T-Menge von 177 mg/l auf 221 mg/l und die Nikkomycin J_T-Menge von 111 mg/l auf 212 mg/l an. Für die natürlichen Nikkomycine kommt es zwar ebenfalls zu einer

Verschiebung, diese ist jedoch überlagert von der Abnahme der Nikkomycine X und I bei Konzentrationen über 3 g/l und für Nikkomycin Z über 2 g/l Asparagin.

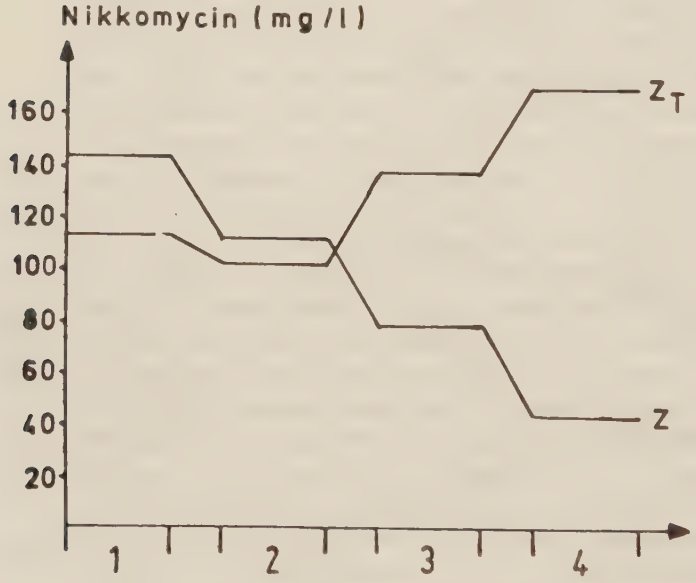


Abb. 7: Optimierung des Mediums (182 Stunden-Werte)
1 = Medium 8
2 = Medium 8 ohne Hefeextrakt
3 = Medium 8 ohne Hefeextrakt + 2 g/l Isoleucin
4 = Medium 8 ohne Hefeextrakt + 2 g/l Isoleucin + 4 g/l Asparagin
Z = Nikkomycin Z
Z_T = Nikkomycin Z_T

Wie man aus Tabelle 1 erkennt, geht die Nikkomycin Z-Bildung mit späteren Thyminzugabezeitpunkten zurück. Für Nikkomycin Z_T liegt der optimale Zugabezeitpunkt zwischen der 24. und 39. Stunde.

Tab. 2: Bestimmung des optimalen Thyminzugabezeitpunktes

	Nikkomycin		
Zeit(h)	Z(mg/l)	Z_T(mg/l)	
0	57	130	Die Nikkomycin-
15	59	146	konzentrationen
24	54	177	wurden nach 182
39	53	181	Stunden ermittelt.
48	46	120	

Für 5-Hydroxymethyluracil wurde das neue Medium ebenfalls getestet. Auch hier lag bei unverändertem Produktverhältnis die Nikkomycin Z_H-Menge fast doppelt so hoch wie bei der Mutante Tü 901/172 in Medium 8.

Da im Fermenter unter standardisierten Bedingungen gearbeitet werden kann, wurde mit diesem Medium eine pH-statische (pH 6) feeding-Fermentation durchgeführt. Der Stamm erreichte im Fermenter schneller die logarithmische Phase, da dieser mit 5 % einer 24 Stunden alten Vorkultur angeimpft wurde. Deshalb erfolgte die Vorstufenzugabe schon nach 16 Stunden. Die Produktbildungsgeschwindigkeit (0,8 mg Nikkomycin Z_T/l/h) blieb über die gesamte Fermentationsdauer "konstant". Bei der Mutante Tü 901/172 lag sie zwar höher (1,1 mg Nikkomycin Z_T/l/h), sie blieb jedoch nur etwa 100 Stunden auf diesem Niveau und fiel danach stark ab (0,25 mg Nikkomycin Z_T/l/h).

Die Biomasse blieb beim Wildtyp zwar unter der der Mutante, dafür war sie aber auch über die gesamte Fermentationsdauer stabil. Bei der Fermentation mit diesem Medium trat wie in den Schüttelkolbenversuchen - unabhängig vom pH-Wert - keine Melaninbildung auf.

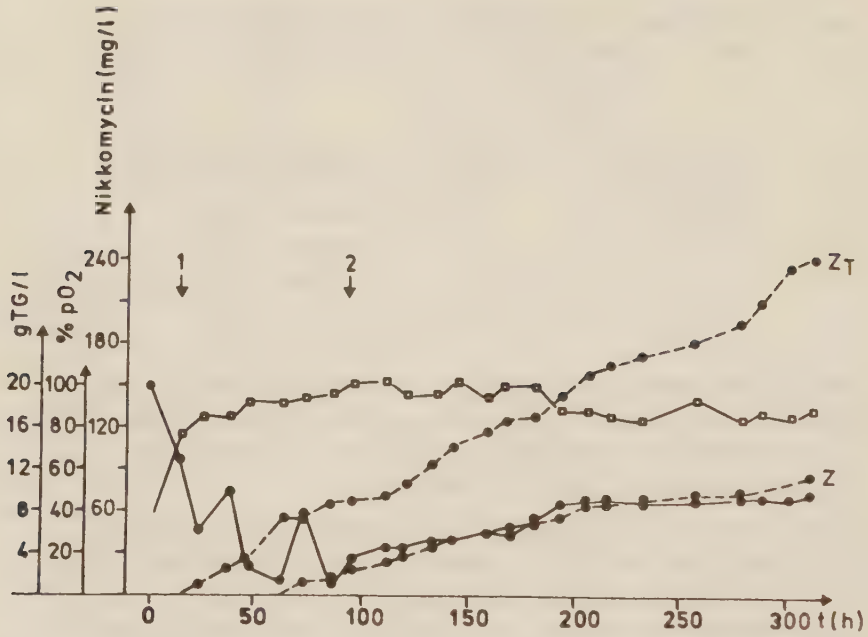


Abb. 8: Gerichtete Fermentation mit Tü 901/8c und Thymin als Vorstufe mit Medium 9.

1 = Thyminzugabe

2 = feeding-Anfang (Feedingrate 0,5 ml/l/h)

—●---●Z_T= Nikkomycin Z_T

—●---●Z = Nikkomycin Z

—□—□ = Trockengewicht

—●—● = % pO_2

Für diese Fermentation wurde eine konstante Feedingrate, die aus einer vorherigen Fermentation hervorging, gewählt. Aus Abbildung 9 erkennt man, daß die Produktbildung etwas niedriger war als in Medium 8, die Selektivität dagegen wesentlich besser, sie entsprach derjenigen der Mutante Tü 901/172 in Medium 8. Im Schüttelkolben kam es in Medium 9 zu einer erhöhten Nikkomycinproduktion (Abb. 7) gegenüber Medium 8.

Dabei muß berücksichtigt werden, daß bei der Fermentation in diesem Medium mit der Vorstufe zusätzlich 1,3 g/l Isoleucin zugegeben wurde.

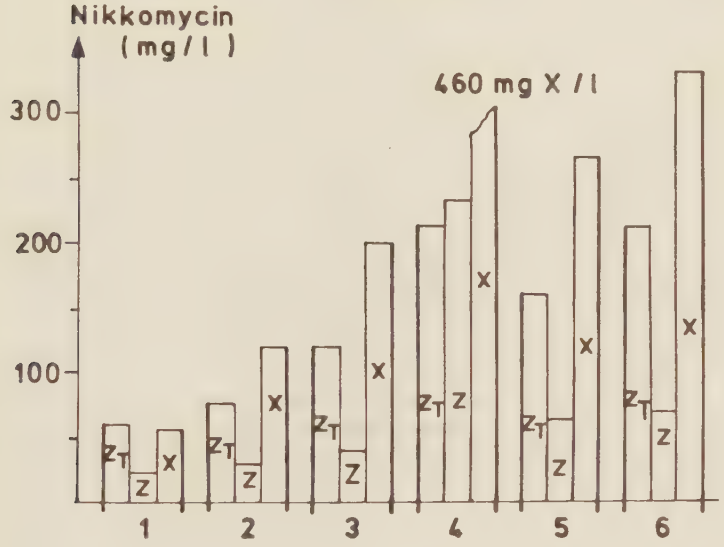


Abb. 9: Vergleich verschiedener Fermentationen mit Thymin als Vorstufe (200 Stunden-Werte)

1 = Tü 901/292 in Medium 8
2 = Tü 901/172 in Medium 8
3 = Tü 901/172 in Medium 8 + Isoleucin nach 50 Std.
4 = Tü 901/8c in Medium 8 + Isoleucin nach 50 Std.
5 = Tü 901/8c in Medium 9
6 = Tü 901/8c in Medium 9 (313 Stunden-Wert)

Z_T = Nikkomycin Z_T
Z = Nikkomycin Z
X = Nikkomycin X

4. Isolierung und Charakterisierung

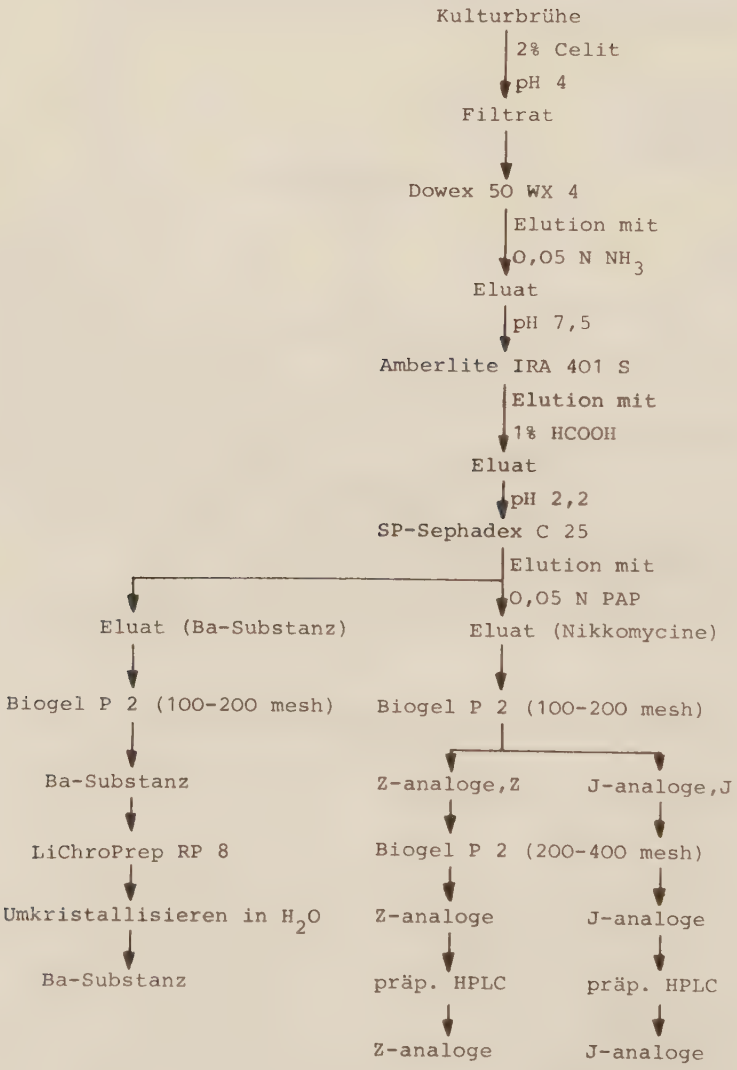


Abb. 10: Aufarbeitungsschema

4.1. Isolierung der Nikkomycine

Da mehrere Komponenten vorlagen, mußte die Aufarbeitung über die HPLC verfolgt werden. Die Isolierung der Nikkomycine (Dehler, 1979) wurde verändert. Der zweite Schritt, die Verwendung des Kationenaustauschers Amberlite IRC 84, wurde durch den Anionenaustauscher Amberlite IRA 401 S ersetzt. Dies hat folgende Vorteile:

- Die Elutionsbedingungen der jeweils vorhergehenden Säule sind die Auftragsbedingungen für die nächste Säule, so daß die Entfernung des Eluenten nicht nötig ist.
- Nur amphotere Verbindungen, wie z.B. die aktiven Nikkomycine, bleiben bei dieser Aufarbeitung übrig.
- Da keine Kationen mehr im Amberlite IRA 401 S-Eluat sind, binden die Nikkomycine an SP Sephadex C 25 vollständig und können in einer scharfen Bande eluiert werden.

Über Gelchromatographie an Biogel P 2 (100 - 200 mesh) wurde das Gemisch - neben der Abtrennung von Verunreinigungen - aufgespalten in die Gruppe der Nikkomycine $Z/Z_T/Z_H$ und $J/J_T/J_H$.

Diese Fraktionen wurden auf eine langsam laufende (14 ml/h) Biogel P 2 (200 - 400 mesh) Säule aufgetragen, da unter diesen Bedingungen die Trennung optimal war. Ein Lauf benötigte jedoch vier Tage. Da die relativ sauberen Substanzen alle am vierten Tag eluiert wurden, konnte jeweils nach 24 Stunden neu aufgetragen werden. Damit war trotz langsamer Fließgeschwindigkeit und geringem Auftragsvolumen eine gute und "schnelle" Auftrennung in die einzelnen Substanzen möglich.

Wie man aus Abbildung 11 erkennt, traten Mischfraktionen zwischen Nikkomycin Z und Z_T (Z_H) auf. Für die J-analogen Verbindungen sieht das Bild ähnlich aus. Diese Mischfraktionen konnten durch mehrmalige Rechromatographie ebenfalls aufgereinigt werden. Die Beseitigung von Nikkomycin X und I durch Barbitursäure oder Dimedon war notwendig, da sonst

eine präparative Abtrennung der neuen Nikkomycine nicht möglich gewesen wäre (Abb. 11), weil sie entweder zwischen Nikkomycin X und Z oder Nikkomycin I und J liefen.

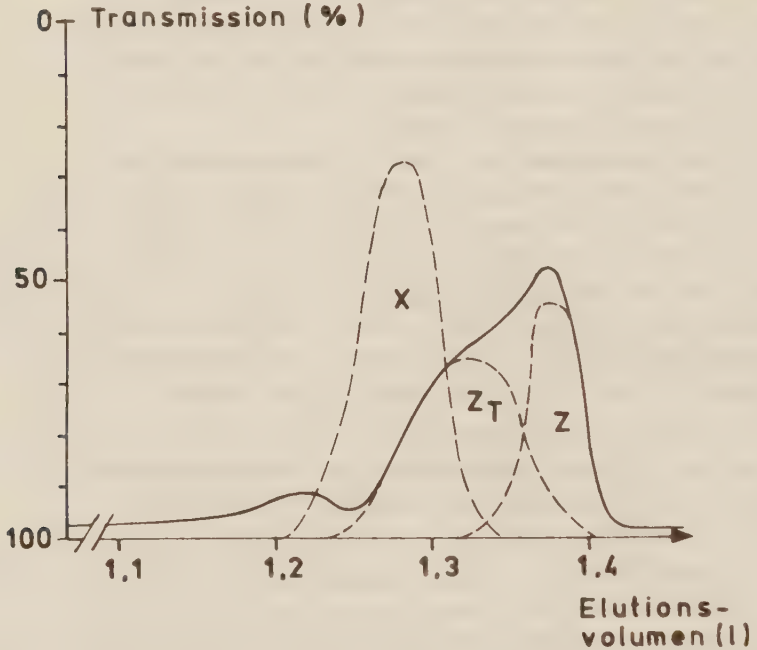


Abb. 11: Elutionsdiagramm der Biogel P 2-Säule (200-400 mesh)

UV-Absorption bei 284 nm

Z_T= Nikkomycin Z_T

Z = Nikkomycin Z

X = Nikkomycin X (hypothetisch)

Über die präparative HPLC wurden vor allem die Zerfallsprodukte und Farbstoffe abgetrennt. Für die Thyminsubstanzen gelang sogar, da sie durch die zusätzliche Methylgruppe lipophiler sind, die Abtrennung von Nikkomycin Z- und J-Resten.

Die 5-Hydroxymethyluracil-Substanzen lassen sich nur über Biogel P 2 von den anderen Nikkomycinen abtrennen, weil die

Laufzeitunterschiede zu Nikkomycin Z und J, nur null bis acht Sekunden, - je nach Lauf - in der analytischen HPLC keine Auftrennung mit der präparativen HPLC erlauben.

Die Endausbeute für Nikkomycin Z_T lag bei über 35 % und für Z_H bei 30 %.

4.2. Isolierung der "roten Substanz" aus der Barbitursäurezugabe

Am Kationenaustauscher SP Sephadex C 25 ließen sich die roten Farbstoffe von den Nikkomycinen abtrennen. Die "roten Fraktionen" wurden konzentriert und über Gelchromatographie an Biogel P 2 (100 - 200 mesh) aufgetrennt. Durch die Verwendung der reversed-phase-Chromatographie konnten sowohl lipophile als auch hydrophile Verunreinigungen abgetrennt werden. Die rote Hauptkomponente wurde nach dem Umkristallisieren in Aqua bidest. wieder in Aqua bidest. aufgenommen und lyophilisiert.

Die Substanz fiel als rotes Pulver an. Sie ist in Wasser mäßig, in Methanol, Aceton und Äthylacetat nicht löslich.

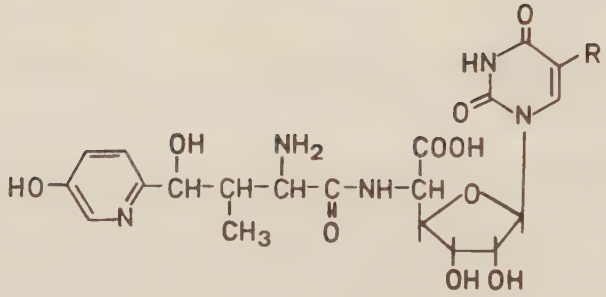
Vermutlich handelt es sich um das Barbitursäurederivat von Nikkomycin B_x (König, 1983).

4.3. Strukturformeln der neuen Nikkomycine

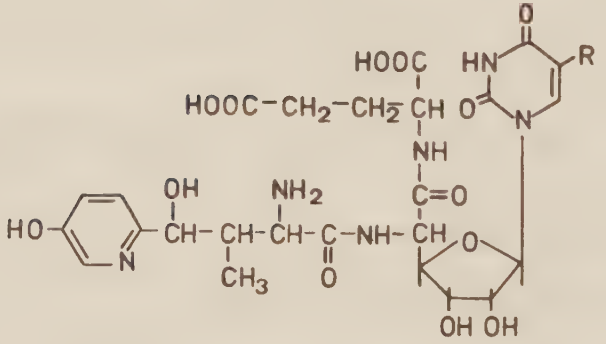
Herrn Professor König gelang es, die neuen Strukturen abzuklären, und er bestätigte die Vermutung, daß Streptomyces tendae Ettlinger Tü 901 5-Formyluracil in 5-Hydroxymethyluracil überführen konnte.

Dafür möchte ich Herrn Professor König nochmals danken.

Abbildung 12 zeigt die Strukturformeln der neuen Substanzen.



Nikkomycin Z-Reihe



Nikkomycin J-Reihe

$R = -CH_3$ Nikkomycin Z_T, J_T

$R = -CH_2OH$ Nikkomycin Z_H, J_H

Abb. 12: Strukturformeln der neuen Nikkomycine

4.4. Physikalische Daten der neuen Substanzen

4.4.1. Stabilitätsverhalten

Die neuen Nikkomycine zeigten genau das gleiche Stabilitätsverhalten wie die natürlichen Nikkomycine Z,X,I und J.

4.4.2. UV- und IR-Spektren der neuen Nikkomycine

Die Abbildungen 13 - 16 geben die UV-Spektren und die Abbildungen 17 - 20 die IR-Spektren der neuen Nikkomycine wieder.

Die Nikkomycine Z_T, J_T, Z_H und J_H weisen in 0,1 N HCl bei 210 nm und 270 nm und in 0,1 N NaOH bei 245 nm und 305 nm Maxima auf.

4.4.3. UV- und IR-Spektren der roten Barbitursäuresubstanz

Abbildung 21 gibt die UV-Spektren und Abbildung 22 das IR-Spektrum der roten Barbitursäuresubstanz wieder.

Die Barbitursäuresubstanz weist in 0,1 N HCl bei 205 nm, 230 nm und 430 nm und in 0,1 N NaOH bei 245 nm, 305 nm und 430 nm Maxima auf.

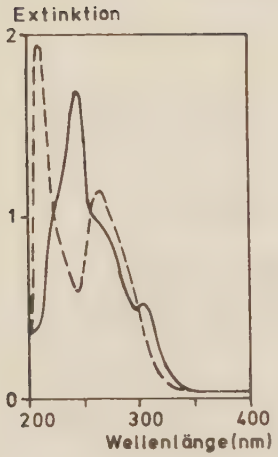


Abb. 13: Nikkomycin Z_T
————in O,1 N HCl,

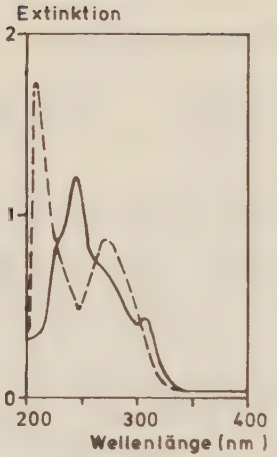


Abb. 14: Nikkomycin J_T
————in O,1 N NaOH

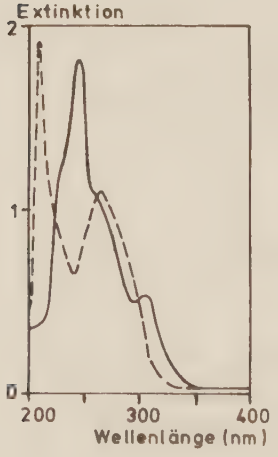


Abb. 15: Nikkomycin Z_H
————in O,1 N HCl,

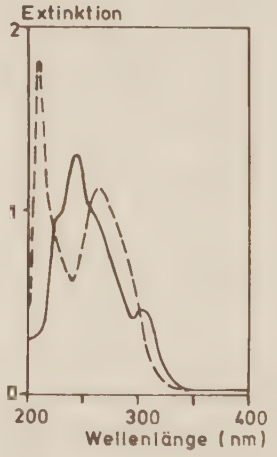


Abb. 16: Nikkomycin J_H
————in O,1 N NaOH

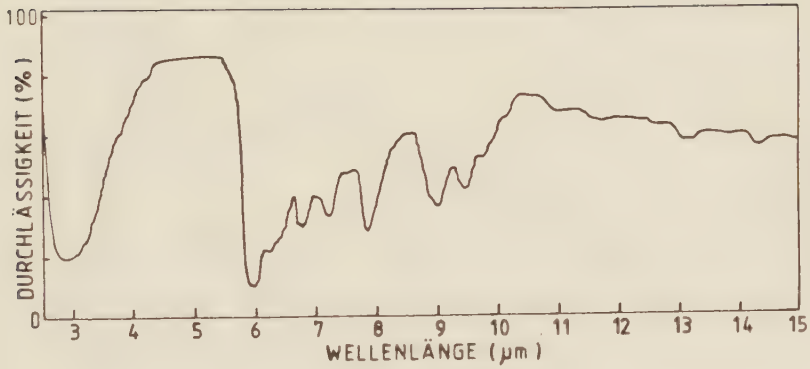


Abb. 17: Nikkomycin Z_T

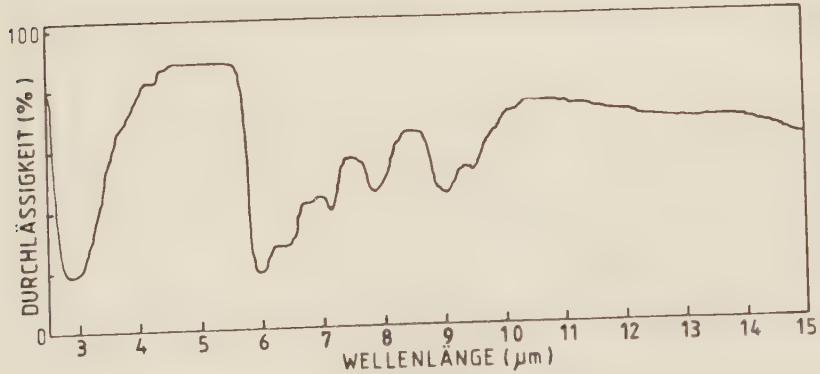


Abb. 18: Nikkomycin J_T

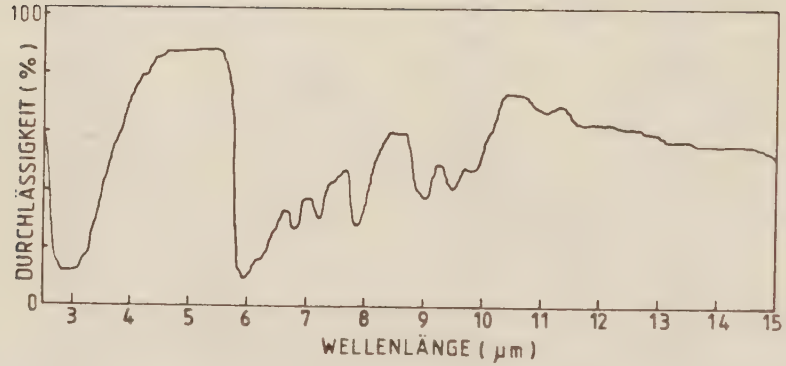


Abb. 19: Nikkomycin Z_H

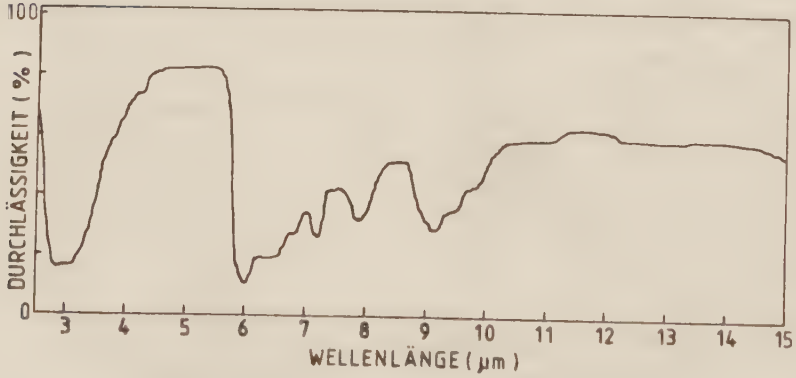


Abb. 20: Nikkomycin J_H

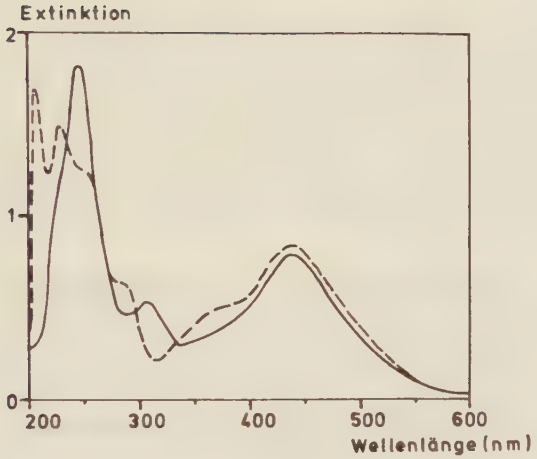


Abb. 21: UV-Spektren der Barbitursäuresubstanz
——— in 0,1 N HCl, ——— in 0,1 N NaOH

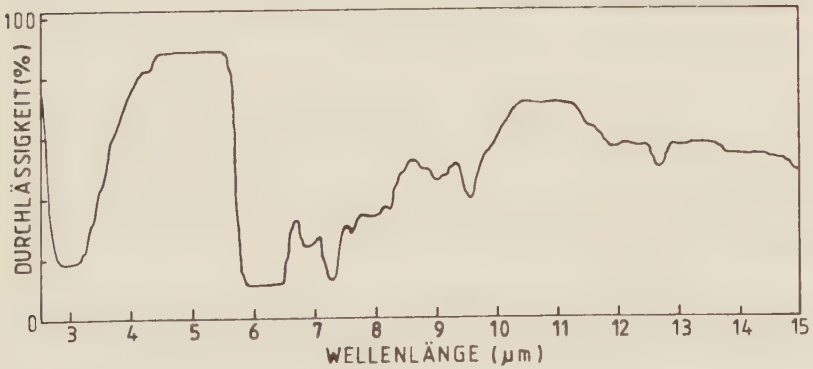


Abb. 22: IR-Spektrum der Barbitursäuresubstanz

4.5. Barbitursäure

Unter den 23 angebotenen Substanzen befand sich auch Barbitursäure. Durch die Zugabe von Barbitursäure trat eine vollständige "Unterdrückung" der Nikkomycin X- und I-Synthese auf. Da beide Nikkomycine besonders problematisch in der Aufarbeitung waren (siehe Abbildung 11), bot es sich an, Barbitursäure in der Fermentation einzusetzen, um eine selektive Produktion zu erzielen.

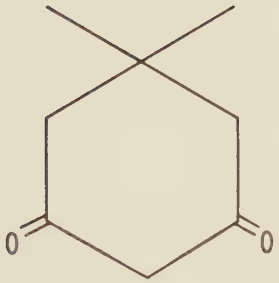
Zur Abklärung des "Barbitursäureeffekts" wurden verschiedene Experimente unternommen, da zuerst ein regulatorischer Effekt wie bei den Anthracyclinen und Rifamycinen (Královcová et al., 1976; Ruczay et al., 1972; Lancini und White, 1973) vermutet wurde. Verfütterungsexperimente im resting-cell-System erbrachten folgende Ergebnisse:

- Die Barbitursäurewirkung läßt sich durch Zugabe von Aldosen und Glucuronsäure (über 100 mM) aufheben, nicht jedoch durch Ketosen (über 100 mM).
- Barbitursäure zeigt keinen negativen Einfluß auf die Synthese der anderen Nikkomycine.
- 5-Chlorbarbitursäure und 5,5-Diäthylbarbitursäure zeigten keine vergleichbare Wirkung.

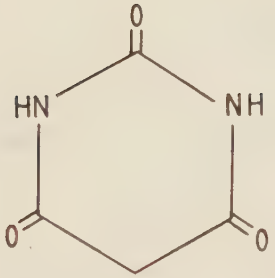
Bei der Fermentation mit dem Wildtyp traten schon vor der Barbitursäurezugabe nachweisbare Nikkomycin X-Mengen auf, diese waren bis zur nächsten Probenahme verschwunden (acht Stunden später). Da Nikkomycine unter diesen Bedingungen stabil sind, ergibt sich, daß Barbitursäure wie Dimedon als Aldehydreagenz wirkt.

Bei Fermentationen mit Mutanten und resting-cell-Versuchen konnte dies nicht beobachtet werden, da zum Zugabezeitpunkt noch kein nachweisbares Nikkomycin X vorhanden war.

Der Vergleich von Dimedon mit Barbitursäure (Abbildung 23) zeigt, daß die reaktiven Gruppen identisch sind.



DIMEDON



BARBITURSÄURE

Abb. 23: Strukturformeln von Barbitursäure und Dimedon

Mit reinem Nikkomycin X wurden die Halbwertszeiten der Dimedon- und der Barbitursäurereaktion bestimmt. Die Reaktionsbedingungen waren: 8 mM Aldehydreagenz, 1 mM Nikkomycin X, 20°C Reaktionstemperatur und ein pH-Wert von pH 6. Für Barbitursäure ergab sich eine Halbwertszeit von $t_{1/2} \simeq$ 0,5 Minuten und für Dimedon eine von $t_{1/2} \simeq$ 30 Minuten. Die Reaktionen wurden mit dem biologischen Test verfolgt (4.1.1.). Wegen den hohen Reaktionsgeschwindigkeiten mußten die Filterrondellen sofort aufgelegt werden, damit durch die Verdünnung der Aldehydreagenzien die Reaktionen gestoppt wurden.

Barbitursäure zeigt im Gegensatz zu Dimedon keinen negativen Einfluß auf die HPLC-Analyse. Dies liegt sicherlich daran, daß die Barbitursäurederivate verkürzte und die Dimedonderivate verlängerte Retentionszeiten aufweisen.

Die Barbitursäurezugabe in Nikkomycin X,I und C_x haltiges Medium führt zur Ausbildung eines roten Farbstoffgemisches. Mit reinem Nikkomycin X erhält man ebenfalls eine rote Farbe.

Die Bildung der roten Farbe ist durch Aufnahme des UV-Spektrums nachweisbar (siehe Abbildung 24).

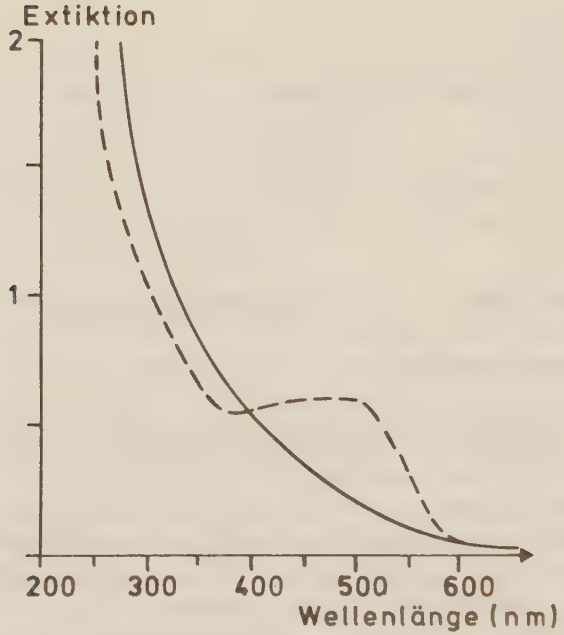


Abb. 24: UV-Spektren von 72 Stunden altem Kulturfiltrat vor und nach Barbitursäurezugabe (RC-Medium)
——— Kulturfiltrat
– – – – Kulturfiltrat nach Barbitursäurezugabe

4.6. Bestimmung der Inhibitorkonstanten der Nikkomycine Z_T, J_T, Z_H und J_H an der Chitinsynthase aus Coprinus cinereus

Die Bestimmung der Hemmkonstanten mit der Chitinsynthase aus Coprinus cinereus nach Dixon (1953) ergab für Nikkomycin Z_T eine K_i von 2,1 µM, für Nikkomycin J_T eine K_i von 14,6 µM, für Nikkomycin Z_H eine K_i von 2,8 µM und für Nikkomycin J_H eine K_i von 19,2 µM.

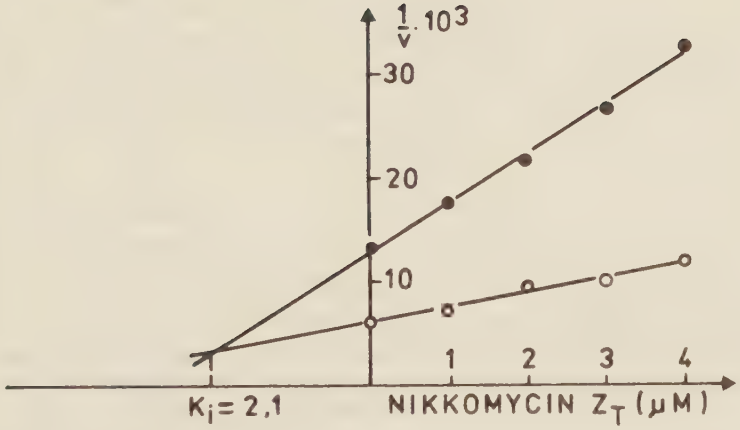


Abb. 25: Dixon-Plot zur Bestimmung des K_i-Wertes von Nikkomycin Z_T

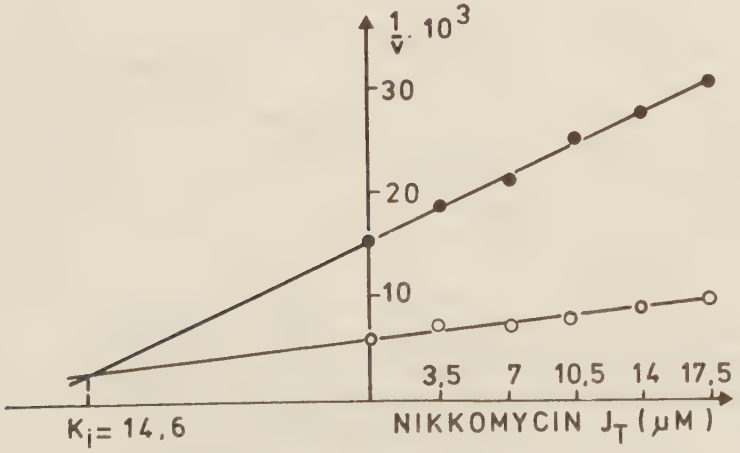


Abb. 26: Dixon-Plot zur Bestimmung des K_i-Wertes von Nikkomycin J_T

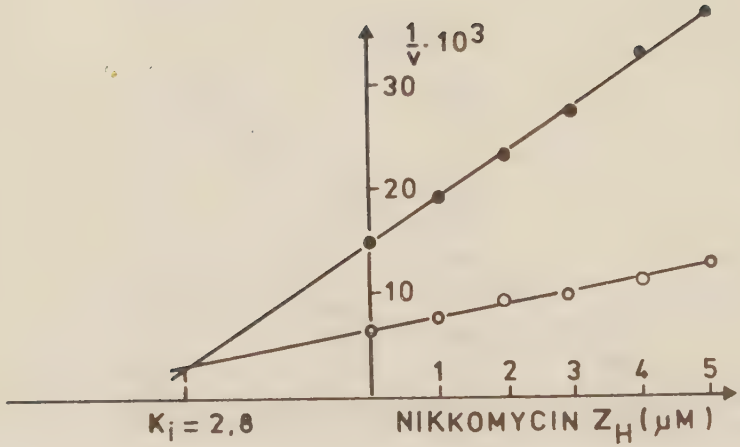


Abb. 27: Dixon-Plot zur Bestimmung des K_i-Wertes von Nikkomycin Z_H

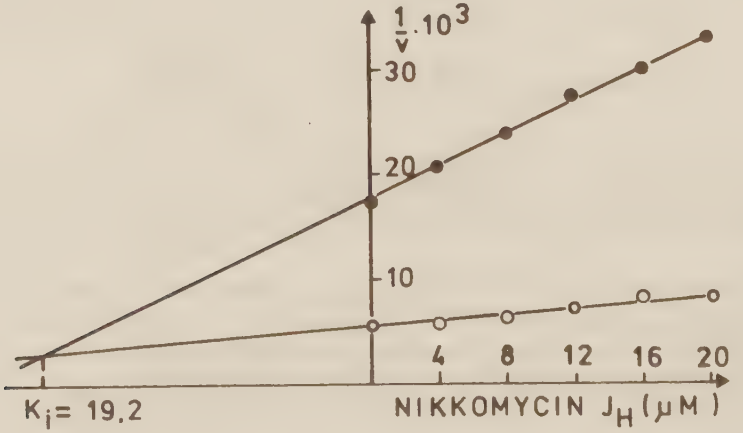


Abb. 28: Dixon-Plot zur Bestimmung des K_i-Wertes von Nikkomycin J_H

Da bei höheren Hemmstoffkonzentrationen (Müller 1981) die Kurven nach oben abknicken, wurden nur Werte im linearen Bereich für die K_i-Wert-Bestimmung herangezogen.

Die Abbildungen 25, 26, 27 und 28 zeigen die Dixon Plots zur Bestimmung der K_i für die Chitinsynthase aus Coprinus cinereus bei Substratkonzentrationen an UDP-N-Acetylglucosamin von:

●——● = 0,5 mM

o——o = 1,0 mM

V = nMol eingebautes N-Acetylglucosamin min^{-1} $mg\ Protein^{-1}$

Für Nikkomycin Z_T ergibt sich die lineare Regressionsgerade
$y = 1,44x + 6,31$ $(r>0,99)$ und $y = 4,73x + 13,21$ $(r>0,99)$
Der Schnittpunkt der Geraden ergibt einen K_i-Wert von 2,1 µM
Berücksichtigt man den Bereich der Standardabweichung, ergibt sich: $K_i = 2,1 \pm 0,25$ µM

Für Nikkomycin J_T ergibt sich:
$y = 0,193x + 6,01$ $(r>0,98)$ und $y = 0,849x + 15,58$ $(r>0,99)$
$K_i = 14,6 \pm 0,4$ µM

Für Nikkomycin Z_H ergibt sich:
$y = 1,3x + 6,29$ $(r>0,99)$ und $y = 4,41x + 14,92$ $(r>0,99)$
$K_i = 2,8 \pm 0,25$ µM

Für Nikkomycin J_H ergibt sich:
$y = 0,13x + 5,66$ $(r>0,99)$ und $y = 0,77x + 17,96$ $(r>0,99)$
$K_i = 19,2 \pm 0,4$ µM

Tab. 3: K_i-Werte der Nikkomycine

Nikkomycin Z_T	K_i = 2,1 µM
Nikkomycin J_T	K_i = 14,6 µM
Nikkomycin Z_H	K_i = 2,8 µM
Nikkomycin J_H	K_i = 19,2 µM
Nikkomycin Z	K_i = 6,6 µM (Müller, 1981)
Nikkomycin X	K_i = 0,7 µM (Müller, 1981)

4.7. Test auf Kreuzresistenz

Da die Nikkomycine und Polyoxine sehr ähnliche Strukturen aufweisen, wurde mit einem polyoxinresistenten Alternaria mali Stamm die Resistenz gegen die Nikkomycine Z_T, J_T, Z_H, J_H, Z und X getestet.

Nur Nikkomycin X zeigte im Plattendiffusionstest eine schwache Hemmwirkung (2000 µM). Gegen den polyoxinsensitiven Alternaria Stamm waren alle getesteten Nikkomycine aktiv, am aktivsten war Nikkomycin X (Abbildung 29).

4.8. Wirkungsspektrum

Der Test wurde mit Ausnahme von Candida albicans im Plattendiffusionstest mit Antibiotikakonzentrationen von 20 µM, 200 µM und 2000 µM durchgeführt.

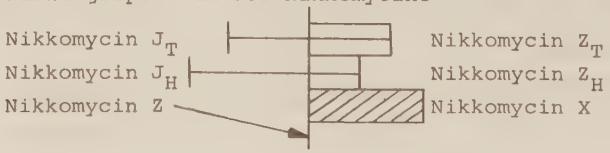
Bei Candida albicans wurde die "Protoplastenbildung" unter Nikkomycineinfluß für die MHK-Bestimmung verwendet. Dieser Test ist ungefähr zehnmal empfindlicher als die Messung der Wachstumshemmung (Frosch, 1983).

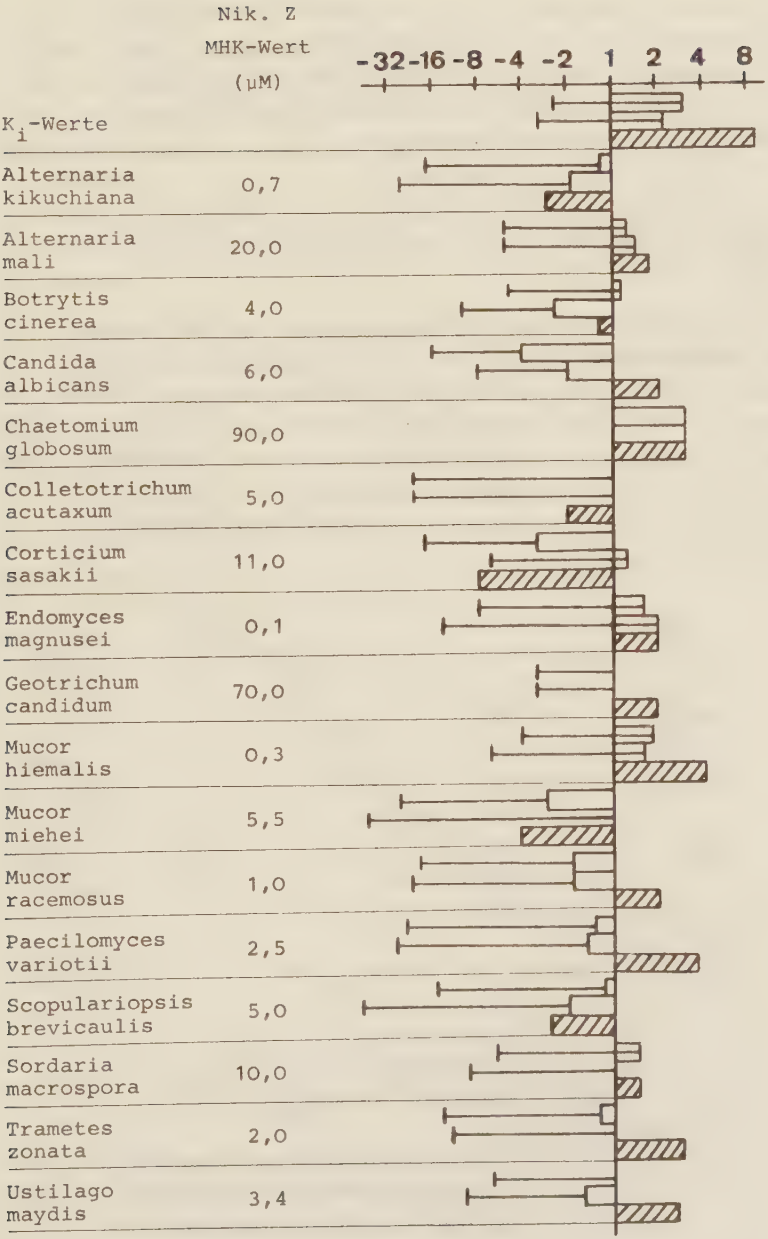
Nikkomycin Z wurde durch gerichtete Fermentation (Kurth, 1981) und Nikkomycin X durch Verwendung der uracilauxotrophen Mutante Tü 901/172 (Delzer, 1980) gewonnen.

Die "MHK"-Werte ergaben sich durch Extrapolation auf den theoretischen "Null-Hemmhofdurchmesser" (0 mm ø). Da die "MHK"-Werte zu einer unübersichtlichen Darstellung führen, wurden die Werte auf Nikkomycin Z normiert und außerdem die K_i-Werte aus Abschnitt 4.6. mit aufgenommen.

Für Trichophyton mentagrophytes konnte in dieser Testanordnung keine Hemmung festgestellt werden.

Abb. 29: Wirkungsspektrum der Nikkomycine




Nik. Z
MHK-Wert
(µM)
-32 -16 -8 -4 -2 1 2 4 8
K_i-Werte
Alternaria kikuchiana 0,7
Alternaria mali 20,0
Botrytis cinerea 4,0
Candida albicans 6,0
Chaetomium globosum 90,0
Colletotrichum acutaxum 5,0
Corticium sasakii 11,0
Endomyces magnusei 0,1
Geotrichum candidum 70,0
Mucor hiemalis 0,3
Mucor miehei 5,5
Mucor racemosus 1,0
Paecilomyces variotii 2,5
Scopulariopsis brevicaulis 5,0
Sordaria macrospora 10,0
Trametes zonata 2,0
Ustilago maydis 3,4

Basislinie ist Nikkomycin Z, da die neuen Nikkomycine Z_T und Z_H substituierte Nikkomycin Z-Derivate sind. Nikkomycin X wurde als anderer Basengrundkörper mitgetestet. Die J-analogen Verbindungen sollten den Einfluß der zusätzlichen Glutamat-Gruppe zeigen.

4.9. Versuche zur Biogenese der 4-Formyl-4-Imidazolin-2-on-Base

Durch die Versuche zur Barbitursäurewirkung und die ungünstigen Fermentationsergebnisse mit der Mutante Tü 901/292 (Abbildung 9) angeregt, wurden Verfütterungsexperimente zur Biogenese der Nikkomycin X-Base durchgeführt. Die höhere Nikkomycinproduktion im neuen resting-cell-System erlaubt außerdem eine Aussage über das Nikkomycin Z : X Verhältnis.

Zuerst wurden die Einflüsse von Histidin, Histidinol und Isoleucin in verschiedenen Konzentrationen getestet.

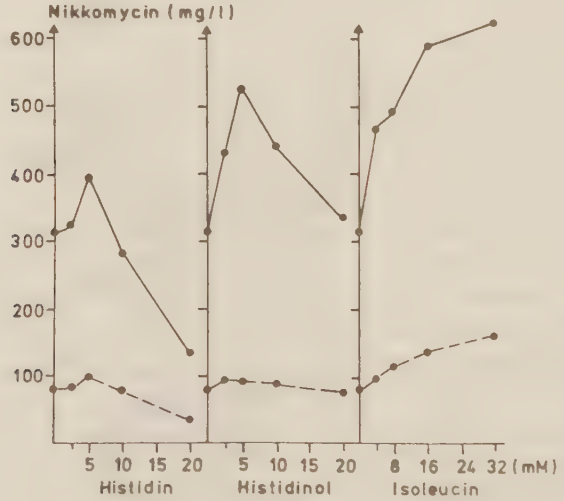


Abb. 30: Verfütterungsergebnisse von Histidin, Histidinol und Isoleucin (Tü 901/8c, 72 Stunden-Werte)
—●——● Nikkomycin X, -●——● Nikkomycin Z

Wie man aus Abbildung 30 erkennt, zeigt Isoleucin einen allgemein stimulierenden Effekt. Histidin bewirkt dies bis 5 mM ebenfalls, höhere Konzentrationen wirken jedoch hemmend. Das Nikkomycin Z/X-Verhältnis wird kaum beinflußt. Histidinol hat bis 5 mM auf die Nikkomycin X-Bildung eine stimulierende Wirkung, die bei höheren Konzentrationen zurückgeht. Nikkomycin Z wird bis 2,5 mM schwach stimuliert. 20 mM Histidinol bewirken ein fast normales Nikkomycin Z/X-Verhältnis.

Da Sulfanilamid die Tetrahydrofolsäurebildung unterdrückt, wird die Purinsynthese (Lehninger, 1979) indirekt gehemmt. ATP ist der Ausgangspunkt der Histidinsynthese, deshalb wurde der Einfluß von Sulfanilamid auf die Nikkomycinbildung untersucht.

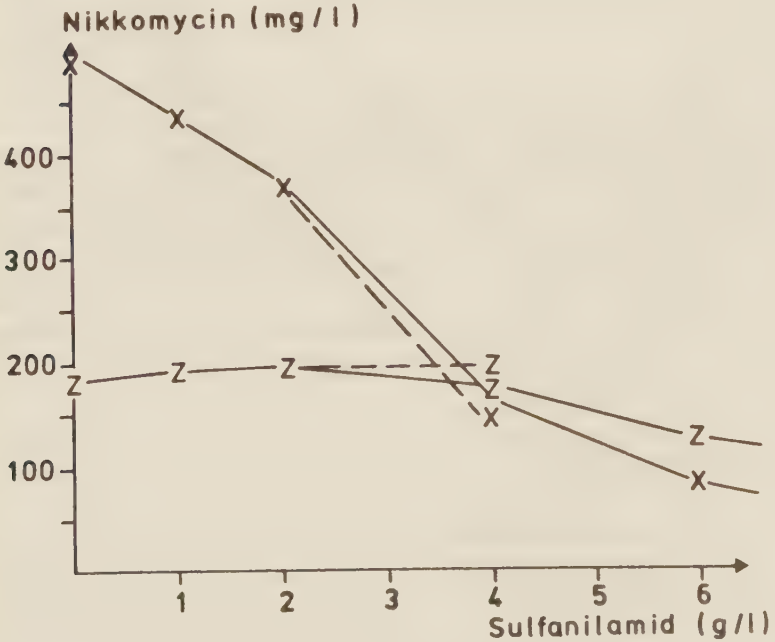


Abb. 31: Wirkung von Sulfanilamid auf die Nikkomycin Z und X-Synthese (72 Stunden-Werte, Tü 901/8c)
– – – – – Z,X mit Adenosin und Guanosin (je 2 g/l)

Abbildung 31 zeigt, daß die Nikkomycin X-Synthese selektiv hemmbar ist. Nikkomycin Z ist zwar bei höheren Sulfanilamidkonzentrationen ebenfalls davon betroffen, dies ist jedoch durch Zugabe von Adenosin und Guanosin, den Endprodukten des Purinstoffwechsels, aufhebbar. Die Nikkomycin X Menge geht dadurch noch weiter zurück. Das resting-cell-Medium enthielt zusätzlich 1,3 g/l Isoleucin.

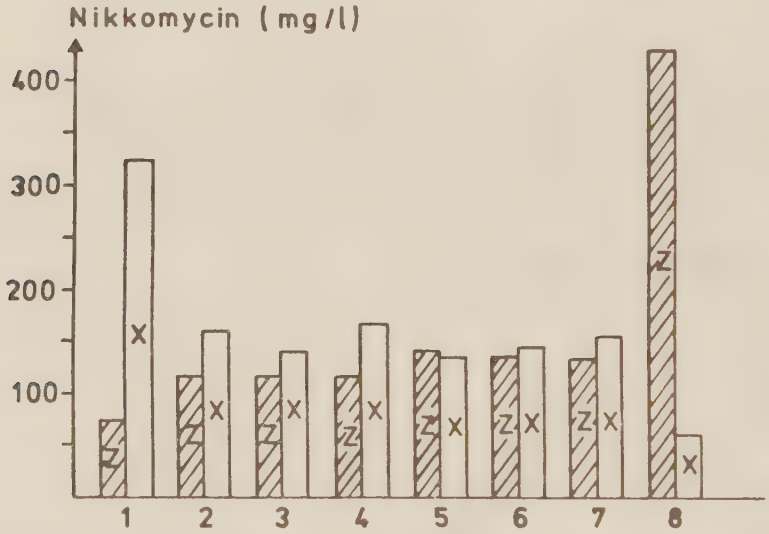


Abb. 32: Nikkomycinproduktion im resting-cell-Medium mit 6 g/l Sulfanilamid (72 Stunden-Werte)

1 = Kontrolle ohne Sulfanilamid
2 = Kontrolle
3 = + 5 mM Histidin
4 = + 5 mM Histidinol
5 = + 10 mM Isoleucin
6 = + 10 mM Adenosin + 10 mM Guanosin
7 = + 10 mM Adenosin + 10 mM Guanosin + 5 mM Histidinol
8 = + 10 mM Uracil

Dieser Versuch (Abbildung 32) brachte folgende Ergebnisse: Histidinol kann die Hemmung durch Sulfanilamid nicht aufheben. Histidin senkt die Nikkomycin X-Bildung geringfügig ab. Adenosin und Guanosin heben die Nikkomycin Z-Synthese an. Uracil führt zu einer starken Nikkomycin Z-Bildung, das beweist, daß Sulfanilamid indirekt spezifisch in den Nikkomycin X-Basenstoffwechsel eingreift. Die Wirkung von Isoleucin hat andere Ursachen. Vergleicht man Abbildung 31 und 32, erkennt man, daß sich 6 g/l Sulfanilamid bei isoleucinstimulierten Zellen wesentlich drastischer auswirkt. Da die Isoleucinzugabe eine Veränderung des Fettsäuremusters der Cytoplasmamembran bewirkt (Kurth, 1982), beruht die stärkere Wirkung wohl auf einer verbesserten Sulfanilamidaufnahme.

Der pH-Verlauf war abgesehen von Histidin sehr ähnlich (± 0,1 pH-Einheiten). Er sank von anfänglich pH 5,8 auf einen pH-Wert von 5,5 ab. Für Histidin stiegen die Werte bis auf pH 6,1 an.

Adenosin und Guanosin wirkten sich im resting-cell-Medium (± 1,3 g/l Isoleucin) ohne Sulfanilamid immer stimulierend auf die Nikkomycin Z- und hemmend auf die Nikkomycin X-Synthese aus.

D-Histidin, ein Hemmstoff des Histidinstoffwechsels, führt ebenfalls zu einer Absenkung der Nikkomycin X-Synthese. Allopurinol, ein Inhibitor der Xanthin-Oxidase, zeigt keinen Einfluß auf das Nikkomycin Z/X-Verhältnis.

IV. DISKUSSION

1. Baseneinbau

Von den 23 angebotenen N-Heterozyklen konnte Streptomyces tendae Ettlinger Tü 901 drei Pyrimidine in die Nikkomycine einbauen. Für Thymin lag die Einbaurate in aktive Nikkomycine bei 5 % und für 5-Hydroxymethyluracil bei 0,8 %.

5-Formyluracil wurde ebenfalls eingebaut und dabei die Formyl- zur Hydroxymethylgruppe reduziert. Ob die Reduktion an der freien Base oder am Nikkomycinmolekül abläuft, kann nicht entschieden werden.

Für die Polyoxine ergab sich, daß Streptomyces cacaoi die Uracilbase erst dann verändert, nachdem sie N-glycosidisch an die Aminohexuronsäure gebunden worden ist. Zuerst wird eine Methylgruppe - aus dem C-3 des Serins - in 5-Stellung eingefügt. Dann wird diese zur Hydroxymethyl- und Carboxylgruppe oxidiert (Isono und Suhadolnik, 1976; Isono et al., 1978). Auch bei den Polyoxinen scheint eine Aldehydgruppe in 5-Stellung nicht möglich zu sein.

Der Nachweis neuer Nikkomycine mit der HPLC ist zwar sehr elegant, er hat aber auch gewisse Nachteile:

- Neue Nikkomycine - vor allem, wenn sie in geringen Mengen gebildet werden -, die mit den bekannten Nikkomycinen gleich laufen, sind praktisch nicht nachweisbar. Für Isoorotsäure konnte, da die neuen Nikkomycine einen anderen isoelektrischen Punkt besitzen müssen, mittels Hochspannungselektrophorese, der HPLC und biologischem Test gezeigt werden, daß trotz kaum verändertem HPLC-Spektrum vermutlich neue Nikkomycine gebildet wurden. Dies galt auch für 5-Formyluracil und 5-Hydroxymethyluracil. Erst mit der Verbesserung der analytischen HPLC (Fiedler, 1982) waren diese neuen Nikkomycine direkt nachweisbar.

- Neue Nikkomycine, die nur in sehr geringen Mengen gebildet werden, sind nicht erfaßbar.

Dem Polyoxinproduzenten Streptomyces cacaoi wurden für Biogenese- und Enzymspezifitätsstudien verschiedene C^{14}-markierte Pyrimidine angeboten. Der Nachweis erfolgte über den radioaktiven Einbau. Trat im aktiven Komplex Radioaktivität auf, wurde die Substanz isoliert. 5-Fluoruracil, 5-Bromuracil und 6-Azauracil können in die Polyoxine eingebaut werden, 5-Hydroxymethyluracil, Thymin, 2-Thiouracil, 4-Thiouracil und 5-Joduracil dagegen nicht (Isono und Suhadolnik, 1976). Das bedeutet, daß das Enzym spezifischer sein muß als bei Streptomyces tendae. Obwohl 5-Hydroxymethyluracil und Thymin in den Polyoxinen als Basen vorkommen, werden sie nicht eingebaut.

Da die Spezifität des für den Baseneinbau verantwortlichen Enzyms wahrscheinlich nicht so groß ist, scheinen die kaum veränderten Pyrimidinbasen dafür geeignet zu sein. Jedoch benötigt man zum Nachweis dieser Substanzen aufwendigere Testmethoden, da in der HPLC kaum Laufzeitunterschiede zu Nikkomycin Z und J auftreten sollten. Dies kann z. B. über radioaktive Markierung oder bei halogenierten Substanzen mit einem Halogendetektor in der HPLC geschehen.

Die Spezifität für den Baseneinbau beruht auf mindestens zwei Reaktionen,

- dem Eintransport der Base:
  Der Eintransport kann wie bei Escherichia coli (Hochstadt-Ozer, 1971) über Gruppentranslokation erfolgen. Die Wege für die einzelnen Purine und Pyrimidine können wie bei Escherichia coli B über verschiedene Transportsysteme laufen (Roy-Burmann, 1975). Manche Substanzen können nur dann transportiert werden, wenn sie in der gleichen tautomeren Form wie Uracil vorliegen (Dalke und Magill, 1979).
- dem Einbau ins Antibiotikum:
  Obwohl 5-Joduracil, 2-Thiouracil, 4-Thiouracil, Thymin und 5-Hydroxymethyluracil in die Zelle gelangen, können sie nicht in die Polyoxine eingebaut werden (Isono und Suhadolnik, 1976).

Von den 23 angebotenen N-Heterozyklen waren vierzehn 6-Ring N-Heterozyklen, vier 5-Ring N-Heterozyklen und fünf Doppelring N-Heterozyklen (Tabelle 1). Für letztere ist die Einbauwahrscheinlichkeit am geringsten, da sie am stärksten vom eigentlichen Substrat abweichen.

Bei den Polyoxinen gelang es, durch Transglykosilierung das entsprechende Adenin-Polyoxin-Derivat herzustellen. Die Verbindung zeigt keine biologische Aktivität (Azuma et al., 1977b). Damit sind solche Produkte nicht so interessant.

Obwohl für die restlichen 19 Basen prinzipiell ein Einbau möglich sein sollte, kann es tätsächlich sein, daß dies nur auf die schon nachgewiesenen zutrifft.

Streptomyces fradiae wurden 30 verschiedene aus anderen Aminoglykosiden isolierte Aminocyclitole angeboten, davon konnte er nur zwei neue einbauen, Streptamin und 2-Epistreptamin (Rinehart, 1977). Andrerseits war Micromonospora purpurea sogar in der Lage, nicht N-haltige Cyclitole für die Synthese neuer Antibiotika zu verwerten (Daum, 1979). Diese Beispiele zeigen, daß die Spezifität der Enzyme doch recht unterschiedlich sein kann.

Bei der Mutasynthese in der Aminoglykosidreihe werden idiotrophe und nicht wie in dieser Arbeit auxotrophe Mutanten verwendet. Dies hat zwei Vorteile:

- Die Mutation im Sekundärstoffwechsel beeinträchtigt die Vitalität des Produzenten nicht (Präve, 1982).
- Die neuen Vorstufen werden in den unspezifischeren Sekundärstoffwechsel eingeschleust (Demain, 1981).

Demgegenüber zeigen die auxotrophen Mutanten von Streptomyces tendae den Nachteil, daß sie weniger produzieren als der Wildtyp - Doppelmutante < Einfachmutante < Wildtyp - und außerdem wesentlich früher lysieren. Dieser Sachverhalt wird auch von anderen Antibiotikaproduzenten beschrieben (Hopwood, 1977).

Bei anderen Mutasynthesen ergaben sich ebenfalls zum Teil unerwartete Produkte. Beim Gentamycin-Produzenten Micromonospora purpurea trat bei der Zugabe von 2,5-Dideoxystreptamin neben 5-Deoxysisomycin das unerwartete 5-Deoxygentamycin auf (Daum, 1979).

Thymin und Uracil werden besser in die Nikkomycine eingebaut als ihre Nukleoside (unveröffentlichte Ergebnisse).

Die pH-Stabilität konnte nicht verbessert werden. Da die Instabilität der Peptidbindung durch den Stickstoff des Pyrimidinrings katalysiert wird (Uramoto et al., 1980), war dies auch nicht zu erwarten.

2. Wirkung der Nikkomycine auf die Chitinsynthase aus Coprinus cinereus

Die Inhibitorkonstante K_i ist als Maß für die Stärke der Hemmstoffbindung (Karlson, 1977) geeignet für Aussagen über Struktur-Wirkungs-Beziehungen. Der Plot nach Dixon (1953) ist für den hier vorliegenden kompetitiven Hemmtyp besonders günstig (Müller, 1981). Für die biologisch aktiven Nikkomycine Z,X,I und B/B_x ist erwiesen, daß sie die Chitinsynthase aus Coprinus cinereus hemmen (Dähn et al., 1976; Hagenmaier et al., 1979; Hagenmaier et al., 1981; König et al., 1980). Müller (1981) konnte zeigen, daß auch die Einzelkomponenten Nikkomycin X und Z sowie Polyoxin A sehr gut gegen die Chitinsynthase aus Coprinus cinereus und Mucor rouxii wirken.

Die kompetitive Wirkung der Polyoxine und Nikkomycine beruht auf ihrer Strukturanalogie zu UDP-N-Acetylglucosamin, das den Chitinsynthasen aus Pilzen (Glaser und Brown, 1957) und Insekten (Jaworski et al., 1963) als Substrat dient.

Studien von Hori et al. (1971; 1974b) ergaben, daß sowohl die ionisierte Aminogruppe in C-2"Position und der Carbonylsauerstoff in C-1"Position als auch die Carboxylgruppe der Aminohexuronsäure für die Bindung ans Enzym wichtig sind.

Substituenten am C5-Atom des Uracils - Methyl-, Hydroxymethyl- und Carboxylgruppen - können die Bindung stark verändern (Hori et al., 1974a).

Als Referenz zu den neuen Substanzen wurden die K_i-Werte von Müller (1981) für die Nikkomycine X (K_i= 0,7 µM) und Z (K_i= 6,6 µM) übernommen.

Da Nikkomycin Z der Grundkörper der neuen Nikkomycine Z_T und Z_H ist, ergibt sich für die Nikkomycine, daß ein zusätzlicher Substituent am C5-Atom des Uracils die Bindung an das Enzym verbessert. Nikkomycin Z_T bindet 3,1-mal und Nikkomycin Z_H 2,4-mal besser an die Chitinsynthase aus Coprinus cinereus.

Das Isoorotsäurederivat - Nikkomycin Z_I -, das in geringen Mengen über die Hochspannungselektrophorese gewonnen werden konnte, zeigte gegen Mucor hiemalis (+/-) nur eine schwache Hemmwirkung (unveröffentlichtes Ergebnis).

Nikkomycin X ist jedoch dreimal aktiver als Nikkomycin Z_T. Ein direkter Vergleich ist jedoch nicht möglich, da sie verschiedene Substituenten besitzen.

Die Ergebnisse bei den Polyoxinen zeigen, daß mit zunehmender Oxidationsstufe die Bindung an das Enzym abnimmt. Auch hier weist der Methylsubstituent sowohl bei den Tri- als auch Dipeptiden die höchste Aktivität auf (Hori, 1971). Sofern die Formylgruppe - höhere Oxidationsstufe - ungünstiger wäre als die Methylgruppe, wäre 4-Imidazolin-2-on ein besserer Grundkörper als Uracil. Damit ergäbe sich als optimaler Substituent 4-Methyl-4-Imidazolin-2-on.

Bei den Neopolyoxinen (Kobinata et al., 1980) führt die Substitution der Formyl- gegen eine Carboxylgruppe zu einer drastischen Abnahme der biologischen Aktivität.

Vergleicht man die Z-analogen Nikkomycine mit ihren J-analogen Verbindungen, sieht man, daß die Tripeptide siebenmal weniger aktiv sind. Bei den Polyoxinen sind die Dipeptide in der Regel 1,5-mal aktiver, jedoch streuen die Werte relativ stark (Hori, 1971). D.h., daß die Polyoxinsäure keinen so negativen Einfluß

auf die Wirksamkeit hat wie die Glutaminsäure bei den Nikkomycinen.

Wichtig bei diesen Versuchen ist die Reinheit der Substanzen, da sich diese neben Wäge- und Verdünnungsfehlern auswirkt. Die angegebenen Standardabweichungen für die einzelnen Regressionsgeraden erfassen diese Fehlerquellen natürlich nicht, sondern beziehen sich nur auf die der gemessenen Verdünnungsreihe und der Testdurchführung.

3. Biologischer Test

Auch im biologischen Test erwies sich Nikkomycin X in den meisten Fällen als bester Hemmstoff. Bezogen auf Nikkomycin Z sind die Abweichungen am größten - zwischen achtmal weniger aktiv gegen Corticium sasakii und viermal aktiver gegen Mucor hiemalis. Für die Nikkomycine Z_T und Z_H fallen die Unterschiede geringer aus - zwischen dreimal aktiver gegen Chaetomium globosum und 2,5-mal weniger aktiv (Nikkomycin Z_H) gegen Botrytis cinerea und viermal weniger aktiv (Nikkomycin Z_T) gegen Candida albicans. Die J-analogen Nikkomycine sind zwischen vier- und vierzigmal weniger aktiv als ihre Z-analogen Verbindungen. In der Regel liegen die Abweichungen ungefähr bei Faktor acht (Abbildung 29).

Da die Chitinsynthasen aus Pilzen konservative Enzyme sind (Gooday, 1979a; Müller, 1981), können die Unterschiede auf verschiedenen Transportsystemen für Di- und Tripeptide beruhen (Mitani und Inoue, 1968; Diddens, 1979).

Damit sind die Ergebnisse bei den Dipeptiden nicht erklärbar. Entweder unterscheiden sich die einzelnen Chitinsynthasen doch stärker, oder außer dem Di- und Tripeptidtransportsystem gibt es noch ein spezifisches Nukleosidtransportsystem, über das die Nikkomycine in die Zellen gelangen. Für Untersuchungen mit dieser Fragestellung wären natürlich Organismen interessant, die starke Unterschiede aufweisen, wie z.B. Corticium sasakii, Mucor hiemalis und Chaetomium globosum.

4. Barbitursäure

Durch die Verwendung von Barbitursäure, die schneller als Dimedon reagiert und die HPLC-Analytik nicht beeinflußt, wurde die Isolierung der neuen Substanzen erleichtert. Barbitursäure ist laut Luckenbach (1981) und Römpp (1976) nicht als Aldehydreagenz bekannt. Da Barbitursäure doppelt so gut in Wasser löslich ist wie Dimedon und die Reaktionsgeschwindigkeit von den Konzentrationen der Reaktanden abhängt, ist dies ein weiterer Vorteil (Christen, 1975).

Die intensive Rotfärbung des Kulturfiltrates durch die Barbitursäurebehandlung kann zwei Ursachen haben:

- Die Reaktionsprodukte aus Nikkomycin X, I, B_x und C_x färben sich rot.
- Da auch Naphtochinone gebildet werden können (Langhärig, 1979) und Barbitursäure mit diesen einen roten Farbstoff bildet (Luckenbach, 1981), kann eventuell ein Teil der Rotfärbung darauf beruhen.

Falls diese nur durch Nikkomycine hervorgerufen wird, läßt sich die Reaktion sowohl im Screening nach Hochleistungsstämmen als auch in der Aufarbeitungs- und Fermentationsanalytik einsetzen.

5. Produktion neuer Nikkomycine

Die Frage, welches Verfahren zur Gewinnung neuer Nikkomycine besser geeignet ist - Mutasynthese oder gerichtete Fermentation - läßt sich nicht eindeutig beantworten:

Universeller ist die Mutasynthese:
Die gerichtete Fermentation ist nur deshalb möglich, weil die neuen Pyrimidinbasen sowohl Nikkomycinvorstufen als auch - indirekt über ihre Nukleotide - Inhibitoren der Uracilsynthese sind. Der UMP-Pool wird weitgehend unterdrückt. Dieser Effekt kann jedoch schon mit der Barbitursäure nicht mehr beobachtet werden. Für Imidazolderivate

ist deshalb ein solcher Effekt nicht sehr wahrscheinlich.

Außerdem ist der Nikkomycinproduzent im Gegensatz zum Polyoxinproduzenten (Isono und Suhadolnik, 1976) und Pasteurella multocida (Flossmann, 1980) in der Lage, Thymin in Uracil zu überführen (unveröffentlichtes Ergebnis). Dies zeigt sich auch daran, daß die Mutanten , die ohne Thyminzugabe kein Nikkomycin Z mehr produzieren, mit Thymin sowohl Nikkomycin Z_T als auch Z bilden (siehe Abbildung 9). Damit geht die Selektivität bei der Mutasynthese verloren.

Die gerichtete Fermentation zeigt bessere Produktausbeuten:

Da der Wildtyp ein besserer Antibiotikaproduzent ist, sollte generell eine höhere Produktion möglich sein. In diesem Fall mußte, um sie selektiv zu gestalten, das schon optimierte Medium (Dehler, 1979) verändert werden. Durch Isoleucin wurde vor allem das neue Produkt stimuliert. Bei höheren Konzentrationen wird vermutlich eine leichte N-Repression ausgelöst, die die Nikkomycin Z-Synthese absenkt. Mit Asparagin konnte dieser Effekt noch verstärkt werden. Die Aktivierung der extern angebotenen Base scheint der N-Repression nicht so stark unterworfen zu sein wie die Demethylierung des Thymins. Diese N-Repression ist auch für andere Organismen beschrieben (Aharonowitz, 1980; Marzluf, 1981), jedoch wurde sie noch nie zur selektiven Synthese neuer Substanzen eingesetzt.

Die Abnahme der Nikkomycin Z_T-Bildung bei höheren Thyminkonzentrationen (>1 g/l) beruht vermutlich auf dem gestörten Pyrimidinbasenverhältnis - über die kompetitive Hemmung der DNA-Polymerase und vor allem der DNA-abhänigen RNA-Polymerase (Kornberg, 1974). Dies ließe sich umgehen, wenn die Methylgruppe wie bei den Polyoxinen erst nachträglich eingeführt wird. Deshalb wäre eine Kombination dieser beiden Produzentenstämme durch Protoplastenfusion (Peberdy, 1980) besonders interessant.

Asparagin führte außerdem zu einer Erhöhung des Tripeptidanteils. Da diese eine Glutamat-Gruppe enthalten, muß Asparagin deren Bildung fördern. Durch Transaminasen - Aspartat-Transaminase - kann die Aminogruppe auf die α-Ketoglutarsäure übertragen werden. Dieser erhöhte Glutaminsäurepool führt dann zu einem größeren Tripeptidanteil. Dabei wird stark in die komplexe N-Regulation (Crüger und Crüger, 1982) eingegriffen, die sich negativ auf die Nikkomycinbildung auswirkt.

Der Phosphatgehalt des neuen Mediums liegt um etwa 40 % (Sykes, 1956) niedriger als der des ursprünglichen. Dies macht sich sowohl im geringeren Trockengewicht als auch in der früh einsetzenden Nikkomycinbildung bemerkbar. Deshalb wäre es sinnvoll, die Phosphatkonzentration zu optimieren, um die Biomasse anzuheben und die Produktbildungsgeschwindigkeit zu erhöhen, ohne eine Phosphatrepression (Martin, 1977) auszulösen.

Im neuen Medium sieht man vor Nikkomycin Z/X (in Abbildung 3 und 4 mit ? bezeichnet) neue Substanzen. Da Nikkomycin B/B_x ungefähr an dieser Stelle laufen soll, die Substanzen nicht mit Isoleucin stimulierbar sind - Isoleucin stimuliert spezifisch die Pyridinringbildung (Sommer, 1981) -, die erste der beiden Verbindungen durch Uracilzugabe erhöht werden kann und die hintere mit Barbitursäure reagiert (Walz, 1983), könnte es sich um Nikkomycin B/B_x handeln. Ein weiterer Hinweis dafür ist, daß anfänglich (Höhne, 1974) ein hefeextraktfreies Medium verwendet wurde und mit der Hefeextraktoptimierung - 0 % → 1 % → 2 % - die Nikkomycine B/B_x verschwanden (Dehler, 1979). Da damals keine leistungsfähige HPLC vorhanden war, konnte dies nicht beobachtet werden.

6. Biogenese der Nikkomycin X-Base

Ergebnisse mit histidinauxotrophen Mutanten zeigten, daß Histidinol vermutlich Vorstufe der Nikkomycin X-Base ist (Langhärig, 1981).

Die neuen Ergebnisse deuten auf eine andere Biogenese hin:

- Die Doppelmutante Tü 901/292 produziert durch minimales Histidinfeeding fast normale Nikkomycin X-Mengen.
- Es gibt zwei Klassen an purinauxotrophen Mutanten - Normalproduzenten und Nikkomycin X reduzierte Produzenten (Bormann, 1983).
- resting-cell-Versuche zeigten:
- Histidin stimuliert Nikkomycin Z/X und hemmt bei Konzentrationen über 5 mM die Synthese über die N-Repression.
- Histidinol kann die spezifische Hemmung durch Sulfanilamid nicht aufheben,
- außerdem stimuliert es zwar bis 5 mM die Nikkomycin X-Synthese, zeigt aber bei 20 mM ein fast normales Nikkomycin Z/X-Verhältnis.
- Adenosin und Guanosin verstärken die Hemmung durch Sulfanilamid und heben die Nikkomycin Z-Bildung an.
- Adenosin und Guanosin führen auch im ungehemmten System zu einer Anhebung der Nikkomycin Z- und Absenkung der Nikkomycin X-Menge.
- D-Histidin hemmt die Nikkomycin X-Synthese.
- Allopurinol zeigt keinen Einfluß auf die Nikkomycin X-Synthese.

Diese Experimente zeigen, daß sich die Nikkomycin X-Base nicht unbedingt vom L-Histidinol ableitet. Da der Purinstoffwechsel einerseits ATP für die Histidinbiosynthese liefert und andrerseits PRAIC (5-Phosphoribosyl-5-Aminoimidazol-4-Carboxamid) aus dem Histidinstoffwechsel in den Purinstoffwechsel fließt, sind die beiden Stoffwechselwege eng miteinander verknüpft.

Insgesamt lassen sich die Ergebnisse auch mit einer Vorstufe aus dem Purinstoffwechsel erklären. Da als Zwischenprodukte aktivierte Imidazolderivate auftreten, gibt es genügend potentielle Vorstufen. Besonders interessant ist PRAIC, da es sowohl neu im Purinstoffwechsel gebildet wird und andrerseits in einem Zyklus gekoppelt an die Histidinsynthese aus diesem zurückfließt. Diese Verbindung erklärt zur Zeit am besten die komplexen Ergebnisse bei der 4-Formyl-4-Imidazolin-2-on Biogenese. Neben einer zweimaligen reduktiven Desaminierung muß nur noch am C-2 die Ketogruppe eingeführt werden.

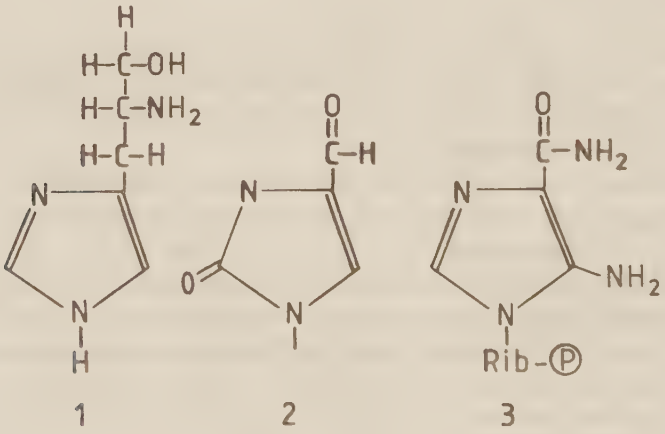


Abb. 33: Strukturvergleich von L-Histidinol (1), 4-Formyl-4-Imidazolin-2-on (2) und PRAIC (3)

Um die damit aufgeworfenen Fragen endgültig abzuklären, sollte man folgende Versuche durchführen:

- Verfütterung von C^{13}- oder C^{14}-Glycin. Da dieses in die Imidazolringstruktur der Purine eingebaut wird, sollte falls PRAIC oder eine verwandte Struktur Vorstufe ist, eine spezifische Markierung nachweisbar sein.
- Verfütterung von C^{13}- oder C^{14}-Histidinol.
- Suche nach verschiedenen Mutanten der beiden Stoffwechselwege.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Durch Mutasynthese konnten je zwei neue Nikkomycine aus der Nikkomycin Z- und J-Reihe gewonnen werden. Thymin und 5-Hydroxymethyluracil wurden in die Nikkomycine eingebaut, 5-Formyluracil dagegen erst nach Überführung in 5-Hydroxymethyluracil.

Für Isoorotsäure ließ sich nachweisen, daß sie vermutlich ebenfalls eine geeignete Vorstufe darstellt.

Der Übergang zur gerichteten Fermentation führte zu einer Produktsteigerung. Das Produktverhältnis konnte durch Optimierung der Isoleucin- und Asparaginkonzentration erheblich verbessert werden.

Die Inhibitorkonstanten der neuen Nikkomycine zeigen, daß ein Substituent am C-5 des Uracils die antibiotische Wirksamkeit verbessert. Die zusätzliche Glutamat-Gruppe bei den Nikkomycinen der J-Reihe verringert die Hemmung um Faktor sieben.

Mit Barbitursäure wurde ein Aldehydreagenz gefunden, das wesentlich schneller als Dimedon reagiert und außerdem die HPLC-Analytik nicht negativ beeinflußt. Die Nikkomycine X,I,C_x und B_x bilden mit dieser rote gut nachweisbare Farbstoffe.

Für die 4-Formyl-4-Imidazolin-2-on Basenbiogenese deutet sich ein neuer Weg an.

VI. LITERATUR

AHARONOWITZ, Y.: Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. Ann. Rev. Microbiol. 34, 209-233 (1980)

AZUMA, T., ISONO, K., CRAIN, P.F. and J.A. MC CLOSKEY: Transnucleosidation: Adenine analogue of the nucleoside skeleton of the Polyoxins. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 5, 159-160 (1977b)

BAUER, K., BISCHOFF, E., v. HUGO, H., BERG, D. und P. KRAUS: Pflanzenschutzpräparate mikrobiologischer Herkunft. In Chemie der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfung (Ed. R. Wegler) 215-328 (1981) Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York

BÉRDY, J.: Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to the chemical structure. Adv. Appl. Microbiol. 18, 309-406 (1974)

BÉRDY, J.: Recent advances in and prospects of antibiotic research. Pro. Biochem. Oct./Nov., 28-35 (1980)

BORMANN, C.:Persönliche Mitteilung (1983)

BRILLINGER, G.U.: Metabolic products of microorganisms. 181. Chitin synthase from fungi, a test model for substanzes with insecticidal properties. Arch. Microbiol. 121, 71-74

CHRISTEN H.R.: Grundlagen der organischen Chemie. Verlag Sauerländer Aarau - Diesterweg-Salle Frankfurt am Main (1975)

CRUEGER, W. und A. CRUEGER: Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie. Akad. Verlagsgesellschaft Wiesbaden (1982)

COHEN, E. and J.E. CASIDA: Properties of Tribolium gut chitinsynthetase. Pestic. Biochem. Physiol. 13, 121-128 (1980a)

COHEN, E. and J.E. CASIDA: Inhibition of Tribolium gut chitin synthetase. Pestic. Biochem. Physiol. 13, 129-136 (1980b)

DÄHN, U., HAGENMAIER, H., HÖHNE, H., KÖNIG, W.A., WOLF, G. and H. ZÄHNER: Nikkomycin, ein neuer Hemmstoff der Chitinsynthese bei Pilzen. Arch. Mikrobiol. 107, 143-160 (1976)

DALKE, P. and J.M. MAGILL: Specifity of uracil uptake in Neurospora crassa. J. Bacteriol. 139, 212-219 (1979)

DAUM, S.J. and J.R. LEMKE: Mutational biosynthesis of new antibiotics. An. Rev. Microbiol. 33, 241-265 (1979)

DAUM, S.J.: New Gentamycin-type antibiotics by mutasynthesis. Microbiology, 312-313 (1979)

DEHLER, W.: Nikkomycine - Studien zur Fermentation und Isolierung. Dissertation Universität Tübingen (1979)

DELZER, J.: Untersuchung des Nikkomycinmusters bei fünf verschiedenen Mutanten von Streptomyces tendae Ettlinger Tü 901. Diplomarbeit Tübingen (1980)

DEMAIN, A.L.: Production of new antibiotics by directed biosynthesis and by use of mutants. In: Future of antibiotherapy and antibiotic research. Academic press, 417-435 (1981)

DIDDENS, H.: Untersuchungen zum Transport von Antibiotika über die Aufnahmesysteme für Oligopeptide und Sideramine. Dissertation Universität Tübingen (1979)

DIXON, M.: The determination of enzyme inhibitor constants. Biochem. J. 55, 170-171 (1953)

Documenta GEIGY: Wissenschaftliche Tabellen. J.R. GEIGY AG, Basel. 7. Auflage (1968)

DUDLEY, H.W. und J. FLEMING: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag (1971)

ENDO, A., KAKIKI, K. and T. MISATO: Mechanism of action of the antifungal agent Polyoxin D. J. Bacteriol. 104, 189-196 (1970)

FIEDLER, H.-P.: Quantitation of Nikkomycins in biological fluids by ion-pair reversed-phase high performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 204, 313-318 (1981)

FIEDLER H.-P.: Persönliche Mitteilung (1982)

FLOSSMANN, K.-D., HÖFER M., ERLER, W. und H. FEIST: Orotsäure - ein Wuchsfaktor für Pasteurella multocida. Zeitschrift für allgemeine Mikrobiol. 21, 85-93 (1981)

FROSCH, I.: The effect of Nikkomycin and Bacilysin on Candida albicans. FEMS in print (1983)

GLASER, L. and D.H. BROWN: The synthesis of chitin in cell-free extracts of Neurospora crassa. J. Biol. Chem. 228, 729-742 (1957)

GOODAY, G.W. and A. de ROUSSET-HALL: Properties of chitin synthetase from Coprinus cinereus. J. Gen. Microbiol. 89, 137-145 (1975)

GOODAY, G.W.: The action of Polyoxin on fungi. Abh. Dtsch. Akad. Wiss. DDR. Reihe N: 159-166 (1979a)

HAGENMAIER, H., KECKEISEN, A., ZÄHNER, H. and W.A. KÖNIG: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 182. Mitteilung: Aufklärung der Struktur des Nukleosidantibiotikums Nikkomycin X. Liebigs Ann., 1494-1502 (1979)

HASENBÖHLER, A.: Instrumentierung von Fermentationsanlagen. Dissertation Universität Tübingen (1978)

HOCHSTADT-OZER, J. and E.R. STADTMAN: The regulation of purine utilization in bacteria. J. Biol. Chem. 246, 5304-5311 (1971)

HÖHNE, H.: Nikkomycin, ein neuer Hemmstoff der mikrobiellen Chitinsynthese. Dissertation Universität Tübingen (1974)

HOPWOOD, D.A. and M.J. MERRICK: Genetics of antibiotic production. Bacteriol. Rev. 41, 595-635 (1977)

HORI, M., KAKIKI, K., SUSUKI, S. and T. MISATO: Studies on the mode of action of Polyoxins. Part 3. Relation of Polyoxin structure to chitin synthetase inhibition. Agric. Biol. Chem. 35, 1280-1291 (1971)

HORI, M., KAKIKI, K. and T. MISATO: Further study on the relation of Polyoxin structure to chitin synthetase inhibition. Agric. Biol. Chem. 38, 691-698 (1974a)

HORI, M., KAKIKI, K. and T. MISATO: Interaction between Polyoxin and active center of chitin synthetase. Agric. Biol. Chem. 38, 699-705 (1974b)

ISONO, K. and R.J. SUHADOLNIK: The biosynthesis of natural and unnatural Polyoxins by Streptomyces cacaoi. Arch. Biochem. Biophys. 173, 141-153 (1976)

ISONO, K., SATO, T., HIRASAWA, K., FUNAYAMA, S. and S. SUZUKI: Biosynthesis of the nucleoside skeleton of the Polyoxins. J. Am. Chem. Soc. 100, 3937-3939 (1978)

ISONO, K. and S. SUZUKI: The Polyoxins: Pyrimidine nucleoside peptide antibiotics inhibiting fungal cell wall biosynthesis. Heterocycles 13, 333-351 (1979)

JAWORSKI, E., WANG, L. and G. MARCO: Synthesis of chitin in cell-free extracts of Prodenia eridania. Nature 198, 790 (1963)

KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Stuttgart - Georg Thieme Verlag (1977)

KIRST, G.: Untersuchungen zur Hemmung der Zygosporenbildung bei Mucor hiemalis. Dissertation Universität Tübingen (1971)

KOBINATA, K., URAMOTO, M., NISHII, M., KUSAKABE, H., NAKAMURA, G. and K. ISONO: Neopolyoxine A, B and C, new chitin synthetase inhibitors. Agric. Biol. Chem. 44, 1709-1711 (1980)

KÖNIG, W.A., HASS, W., DEHLER, W., FIEDLER, H.-P. und H. ZÄHNER: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, 189. Strukturaufklärung und Partialsynthese des Nukleosidantibiotikums Nikkomycin B. Liebigs Ann. Chem. 622-628 (1980a)

KÖNIG, W.A. PFAFF, K.-P., BARTSCH, H.-H., SCHMALLE, H. und H. HAGENMAIER: Konfiguration von 2-Amino-4-hydroxy-4-(5-hydroxy-2-pyridyl)-3-methylbuttersäure, der N-terminalen Aminosäure der Nikkomycine. Liebigs Ann. Chem. 1728-1735 (1980b)

KORNBERG, A.: DNA replication. W.H. Freeman and company (1974)

KRÂLOVCOVÂ, E., BLUMAUEROVÂ, M.and Z. VANĚK: The effect of 5,5-Diethylbarbituric acid on the biosynthesis of Anthracyclines in Streptomyces galilaeus. Folia Microbiol. 22, 182-188 (1977)

KURTH, R.: Untersuchungen zur Regulation der Nikkomycinbildung und Optimierung einer pO_2-feeding-Fermentation. Dissertation Universität Tübingen (1981)

KURTH, R.: Persönliche Mitteilung (1982)

LANCINI G. and R.S. WHITE: Rifamycin fermentation studies. Process Biochem. July, 14-16 (1973)

LANGHÄRIG, J.: Aufstellung eines Produktionsspektrums von Tü 901 - Streptomyces tendae Ettlinger. Diplomarbeit Universität Tübingen (1979)

LANGHÄRIG, J.: Untersuchungen von Mutanten des Nikkomycin-produzenten Tü 901. Dissertation Universität Tübingen (1981)

LEHNINGER, A.L.: Biochemie. Verlag Chemie - Weinheim-New York (1979)

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and R.J. RANDALL: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

LUCKENBACH, R.: Beilsteins Handbuch der Organischen Chemie: 3.-4. Ergänzungswerk 24. Band. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg- New York 1873-1874 (1981)

LYR, H. und G. BISCHOFF: Zum problem der Resistenzbildung von Pilzen gegenüber modernen Fungiziden. Biol. Rundschau 18, 365-372 (1980)

MARTIN, J.F.: Control of antibiotic synthesis by phosphate. Adv. Biochem. Eng. 6, 105-127 (1977)

MARZLUF, G.A.: Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. Microbiol. Rev. 45, 437-461 (1981)

MISATO, T., KO, K. and I. YAMAGUCHI: Use of antibiotics in agriculture. Adv. Appl. Microbiol. 21, 53-88 (1977)

MITANI, M. and Y. INOUE: Antagonists of antifungal substance Polyoxin. J. Antibiot. 21, 492-496 (1968)

MÜLLER, H.: Nikkomycin X aus Streptomyces diastatochromogenes Tü 2038 und Streptomyces aburaviensis Tü 1250 - Isolierung, Identifizierung und Versuche zur Wirkungsweise. Dissertation Universität Tübingen (1981)

PEBERDY, J.F.: Protoplast fusion. Enzyme Microb. Technol. 2, 23-29 (1980)

PERLMAN, D.: Microbial production of antibiotics. In: Mi Microbial Technology - Microbial Processes. Second Edition, Vol. 1 (Eds.: Peppler and Perlman) Academic Press, 241-281 (1979)

PRÄVE, P., FAUST, U., SITTIG, W. und D.A. SUKATSCH: Handbuch der Biotechnologie. Akad. Verlagsgesellschaft Wiesbaden (1982)

RINEHART, K.L.J.: Mutasynthesis of new antibiotics. Pure Appl. Chem. 48, 1361-1384 (1977)

RÖMPP, H.: Römpps Chemie-Lexikon. Franckh´sche Verlagshandlung Stuttgart 303-304 (1976)

ROY-BURMANN, S. and D.W. VISSER: Transport of purines and deoxyadenin in Escherichia coli. J. Biol. Chem. 250, 9270-9275 (1975)

RUCZAJ, Z., OSTROWSKA-KRYSIAK, B., SAWNOR-KORSZYNSKA, D. and K. RACZYNSKA-BOJANOWSKA: On the effect of barbital on Streptomyces mediterranei. Acta microbiol. pol. Ser. B 4, 201-209 (1972)

SASAKI, S., OHTA, N., YAMAGUSHI S., KURODA, S. and T. MISATO: Nippon Nogei Kagaku Kaishi 42, 633 (1968)

SHIER, W.T., RINEHART, K.L. and D. GOTTLIEB: Preparation of four new antibiotics from a mutant of Streptomyces fradiae. Nat. Acad. Sci. 63, 198-204 (1969)

SOMMER, U.: Persönliche Mitteilung (1981)

SYKES, G.: Constituents of bacteriological culture media. Cambridge Univ. Press, Eng. (1956)

URAMOTO, M., KOBINATA, K. and K. ISONO: Structures of Neopolyoxins A, B and C. Tetrahedron letters 21, 3395-3398 (1980)

WALZ, F.: Persönliche Mitteilung (1983)

WEIGELE, M., DE BERNARDO, S.L. and W. LEIMGRUBER: Fluorometric assay of secondary amino acids. Biochem. Biophys. Res. Commun. 50, 352-356 (1976)

ZÄHNER, H. and W.K. MAAS: Biology of antibiotics. Springer-Verlag, Berlin (1972)

ZÄHNER, H.: The search for new secondary metabolites. In: Antibiotics and other secondary metabolites. 1-17 (Eds.: R. Hütter, T. Leisinger, J. Nüesch and W. Wehrli), London-New York-San Francisco, Academic Press (1978)

ZITZMANN, W.: Brevienomycine. Auftrennung und Charakterisierung eines komplexen Antibiotikagemisches aus Streptomyces violaceoniger Tü 1612. Dissertation Universität Tübingen (1980)

ZOEBELEIN, G.: AMS 0896, ein Antibiotikum mit entwicklungshemmenden Eigenschaften bei Spinnmilben. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem, Heft 191, 282 (1979)

ZOEBELEIN, G.: Freilandversuche mit AMS 0896 gegen Spinnmilben im Obstbau. Vortrag, St. Gallen (1980)

Lebenslauf

6.3.1954	geboren in Wolfsburg
1961-1965	Grundschule in Lörrach-Tumringen
1965-1970	Theodor-Heuss-Realschule in Lörrach
11.7.1970	Reifeprüfung
1970-1973	Technisches Gymnasium in Lörrach
7.6.1973	Reifeprüfung
1.1.1974- 31.3.1975	Wehrdienst
ab SS 1975	Biologiestudium an der Universität Tübingen
25.4.1977	Diplomvorprüfung in Biologie
28.5.1980	Diplomhauptprüfung in Biologie
	anschließend Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Zähner

Meine akademischen Lehrer waren:

D. Ammermann, W. Bessler, V. Braun, D. Bunke, H. Frank,
J. Guglielmi, K.-P. Hadeler, A. Hager, V. Hemleben, G. Jung,
W. Löffler, D. Mecke, H. Meier, H. Metzner, G.F. Meyer,
W. Nakel, F. Oberwinkler, K. Pelling, W. Rähle, A. Rieker,
E. Sander, B. Schwemmle, H. Seiler, W. Seyffert, D. Sperlich,
H. Stegmann, J. Strähle, H. Straub, G. Weitzel, P. Wenk,
K. Wöhrmann, H. Wolf, H. Zähner.